

**BACKBONE-ACYLIERUNG
ALS NEBENREAKTION BEI DER
FESTKÖRPERSYNTHESE VON HEXALEUCIN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Bernd Schilling

aus Griessen/D

Basel 1973

**BACKBONE-ACYLIERUNG
ALS NEBENREAKTION BEI DER
FESTKÖRPERSYNTHESE VON HEXALEUCIN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

Bernd Schilling

aus Griessen/D

Basel 1973

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät auf Antrag der

Herren Prof. Dr. M. Brenner und PD Dr. H. Seiler

Basel, den 13. März 1973

Prof. Dr. M. Eichler

Dekan



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. M. Brenner
im Institut für Organische Chemie der Universität
Basel ausgeführt.

Herrn Professor Dr. M. Brenner und Herrn Dr. P. Fankhauser
möchte ich für ihre stete Hilfe und das Interesse, das sie
dieser Arbeit entgegenbrachten, herzlich danken.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite:
1. Einleitung	1
1.1. Die Festkörper-Peptidsynthese	1
1.1.1. Voraussetzungen für die Brauchbarkeit der Festkörpersynthese	2
1.1.2. Die Merrifield-Technik	5
1.1.2.1. Fixierung der N-geschützten Start- aminosäure	5
1.1.2.2. Schutzgruppen-Abspaltung	6
1.1.2.3. Kupplung	6
1.1.2.4. Spaltung der Bindung zwischen Peptid und Harz	7
1.1.3. Diskussion	8
1.2. Nebenreaktionen bei der Festkörpersynthese: Stand der Literatur	9
1.2.1. Auslassung, Kettenabbruch: A-Lückenpeptide und Rumpfpeptide	9
1.2.2. Intermolekulare Aminolyse: Pfropf- und Schnittpeptide	10
1.2.3. Intramolekulare Aminolyse	11
1.2.4. Esterspaltung	12
2. Peptidspaltung als Folge von Backbone-Acylierung?	13
3. Problemstellung	14
4. Theoretischer Teil	15
4.1. CHemie der Diacylimide	15
4.2. Regeneration	18
4.3. Bildung von B-Lückenpeptiden	19
4.4. Die Aminoacyleinlagerung (AAE)	19
4.5. Nachweisverfahren für Einlagerungspeptide und BA	23
5. Harzanalytik	26
5.1. Analytische Zielsetzung	26

	Seite:
5.2. Methodik	31
5.2.1. Indirekte Umsatzanalytik: Zwischen- schaltung einer Hilfsreaktion	31
5.2.1.1. Umsatzanalytik über Säure/Base- austausch	31
5.2.1.2. Umsatzanalytik über Aldehyd-Aus- tausch (Schiff'sche Basen)	32
5.2.1.3. Umsatzanalytik mit markierten Acylierungsreagenzien	34
5.2.1.4. Varianten	34
5.2.1.5. Vergleich der Methoden 5.2.1.1. bis 5.2.1.3. an Oligoleucin-Polymeren	35
5.2.2. Direkte Umsatzanalytik	39
5.3. Grundsätzliche Überlegungen zur Harzanalytik	39
5.4. Zusammenfassung	41
6. Synthesen	42
6.1. BOC-Hexaleucyl-Polymer	42
6.2. Oligoleucyl-Polymere	43
6.3. Oligoleucine	44
6.4. Acyl-(Leucyl) _n -Polymere	46
6.5. Das SP-Peptid Benzoylhexaleucin	49
6.5.1. Fraktionierung	49
6.5.2. Spektroskopische Daten und Elementar- analysen	51
6.5.3. Löslichkeiten	51
6.5.4. Dünnschichtchromatographische Untersu- chungen	52
6.5.5. Säulenchromatographische Untersuchungen	54
6.5.6. Die Herkunft von Benzoylleucylmethylester	59
7. Simuliercyclen mit BOC-Phe bzw. NPS-Phe	60
7.1. Simuliercyclen an Benzoylhexyleucyl-Polymer	60
7.2. Simuliercyclen an Acyl-(Leucyl) _n -Polymeren	61

8. Filtration der nachbehandelten Acylpeptide über Sulfosäureharz	62
9. Hydrolysen	63
10. Aminosäureanalysen	64
11. Ergebnisse und Diskussion	66

	Seite:
Experimenteller Teil	70
1. Analytik	71
1.1. Harz-Analytik	71
1.1.1. 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd-Methode nach Esko	71
1.1.2. Ninhydrin-Test nach Kaiser	72
1.1.3. Restbeladungsbestimmung nach Dorman	73
1.2. Aminosäure-Analytik	73
1.2.1. Analysenapparatur	73
1.2.2. Analysen-Prozedur	75
1.2.3. Reagenzien	76
1.2.4. Aminosäure-Analysen der Hydrolysate von nachbehandeltem Irr-(Leu) _n	79
2. Synthese von Oligoleucinen und deren Derivaten	81
2.1. Apparatur	81
2.2. Lösungsmittel, Reagenzien	82
2.3. Synthese von BOC-(Leu) ₆ -P	83
2.4. Synthese von BOC-(Leu) _n -P	85
2.5. Synthese von BOC-Phe-(Leu) ₆ -P	86
2.6. Synthese von Bz-(Leu) ₂	87
2.7. Synthese von NPS-Phe	87
3. Acylierungsreaktionen	89
3.1. Freisetzung von (Leu) ₆ -P aus BOC-(Leu) ₆ -P	89
3.2. Umsetzung von (Leu) ₆ -P mit Ac ₂ O/NEt ₃	89
3.3. Umsetzung von (Leu) ₆ -P mit Ac ₂ O/Py	89
3.4. Umsetzung von (Leu) ₆ -P mit BzCl/Py	90
3.5. Umsetzung von (Leu) ₆ -P mit 3-Sulfopropionsäure- anhydrid	91
3.6. Umsetzung von (Leu) ₆ -P mit 3-Nitrophthalsäure- anhydrid	92
3.7. Umsetzung von (Leu) _n -P mit BzCl/Py	92
3.8. Umsetzung von (Leu) _n -P mit Acetimidazol	92
4. Simuliercyclen	94
4.1. Methode	94

4.2. Simuliercyclen an Bz-(Leu) ₆ -P mit BOC-Phe	94
4.3. Simuliercyclen an Bz-(Leu) ₆ -P mit BOC-Phe auf automatischem Synthesegerät	95
4.4. Simuliercyclen an Bz-(Leu) ₆ -P mit NPS-Phe auf Synthesegerät	98
4.5. Simuliercyclen an Bz-(Leu) _n -P und Ac-(Leu) _n -P mit BOC-Phe	102
5. Ablösung der Peptide vom Harz	
5.1. Methode	103
5.2. Abspaltung von BOC-(Leu) ₆ -P	104
5.3. Abspaltung von Bz-(Leu) ₆ -P	104
5.4. Abspaltung von SPA-(Leu) ₆ -P	105
5.5. Abspaltung von NPA-(Leu) ₆ -P	105
5.6. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆ -P	105
5.7. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆ -P	106
5.8. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆ -P	106
5.9. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆ -P	106
5.10. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆ -P	106
5.11. Abspaltung von nachbehandeltem Irr-(Leu) _n -P	107
5.12. Abspaltung von BOC-Phe-(Leu) ₆ -P	108
6. Reinigung und Charakterisierung der beiden Bz-(Leu) ₆ - Fraktionen	109
6.1. Säulenchromatographie an LH 20	109
6.2. Äquivalentgewichtsbestimmung	109
7. Filtration über Dowex 50 W x 2	110
7.1. Methode	110
7.2. Filtration von Bz-(Leu) ₆	111
7.3.-7.7. Filtration von nachbehandeltem Bz-(Leu) ₆	112
7.8. Filtration von nachbehandeltem Irr-(Leu) ₆	112
7.9. Filtration eines Gemisches von Bz-(Leu) ₆ und Phe-(Leu) ₆	112

8. Hydrolysen	114
8.1. Methode	114
8.2. Hydrolyse von Irr-(Leu) _n	114
9. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	115
9.1. DC von (Leu) _n	115
Zusammenfassung	116
Literaturverzeichnis	118
Curriculum vitae	121

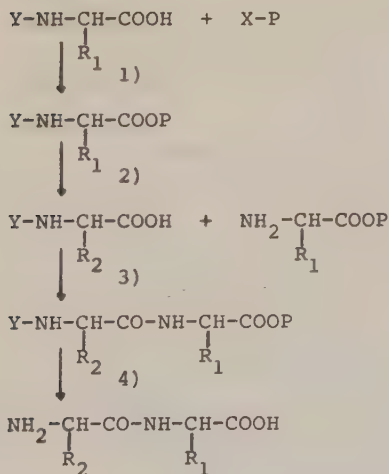
1. Einleitung

1.1. Die Festkörper-Peptidsynthese

(Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS))

Im Jahre 1963 erschloss R.B. Merrifield durch die Synthese des Tetrapeptides L-Leucyl-L-Alanyl-Glycyl-Valin an einem Festkörper eine neue Möglichkeit, Peptide zu synthetisieren. "It involved the stepwise addition of protected amino acids to a growing peptide chain which was bound by a covalent bond to a solid resin particle"¹.

Zur Illustration diene nachfolgendes vereinfachtes Reaktionsschema:



X= aktive Gruppe am Polymer

Y= Schutzgruppe

P= Polymer, Träger, Festkörper, Matrix

- ad 1) Die aktivierte Carboxyl-Funktion der N-geschützten Aminosäure reagiert mit der aktiven Gruppe X am Festkörper, wodurch eine chemische Bindung zum Festkörper entsteht.
- ad 2) Die Aminoschutzgruppe der harzfixierten Aminosäure wird abgespalten. Die Aminofunktion wird dadurch für den ersten Kupplungsschritt frei.
- ad 3) Die N-geschützte, aktivierte Aminosäure reagiert mit der Aminofunktion der harzfixierten Aminosäure unter Bildung eines N-geschützten Dipeptides.
- ad 4) Das Peptid wird vom Festkörper abgelöst unter gleichzeitiger Freisetzung der Aminofunktion. Wir bezeichnen es im folgenden als "Solid-Phase-Peptid". Die Begründung für diese Bezeichnung wird sich aus dieser Arbeit ergeben.

1.1.1. Voraussetzungen für die Brauchbarkeit der Festkörpersynthese

Um einen befriedigenden Syntheseverlauf zu erzielen, müssen gewisse chemische und physikalische Grundvoraussetzungen erfüllt sein.

Der Festkörper (Träger) darf ausser X keine zusätzlichen reaktiven Gruppen besitzen, die während des Syntheseverlaufes mit einem der Reaktionspartner reagieren könnten. Daruas ergibt sich als weitere Forderung, dass die reaktive Gruppe X quantitativ mit der 1. Aminosäure umgesetzt werden muss. Die entstandene chemische Bindung darf im Verlaufe der Synthese nicht gespalten werden, da neben dem Peptidverlust eine spätere Aufkupplung einer anderen Aminosäure zu falschen Produkten führen würde.

Die Verwendung eines Trägers ist sehr wesentlich von dessen Quellbarkeit abhängig. Diese ist einerseits eine Funktion des Vernetzungsgrades der Polymerketten und andererseits eine Funktion der Solvatisierbarkeit durch das verwendete Lösungsmittel. Es muss bedacht werden, dass eine relativ geringfügige Polaritätsänderung der harzfixierten Peptidkette (z.B. infolge von Verlängerung oder von Schutzgruppenabspaltung) die Solvatisierbarkeit und infolgedessen auch die Quellbarkeit der Matrix wesentlich verändern kann. Eine beschränkte Quellfähigkeit schränkt jedoch nicht nur die Beweglichkeit der fixierten Peptide, sondern auch die Diffusion der Reagenzien ein.

Jedes "Solid-Phase-System" ist im Grunde ein System zweier flüssiger Phasen, der überstehenden Lösung einerseits und der gequollenen Peptid-beladenen Matrix andererseits. Es ist nicht zu erwarten, dass die Konzentration eines Reaktionspartners in beiden Phasen dieselbe ist. Das Verhältnis dieser Konzentrationen ist durch einen Verteilungskoeffizienten gegeben. Um die für die Synthese optimale Konzentration eines Reaktionspartners in der Harzphase zu erreichen, wäre die Kenntnis der jeweiligen Verteilungskoeffizienten unbedingt erforderlich. Die mechanischen Eigenschaften des Festkörpers sollen so beschaffen sein, dass keine mechanische Zerkleinerung in Form von "Abrieb" auftritt.

Bei der Wahl der Schutzgruppe muss berücksichtigt werden, dass sie selektiv, z.B. neben einer Benzylesterbindung hydrolysiert werden muss. Die Folgen einer Benzylesterhydrolyse auf den Stufen 2 und 4 im Schema auf Seite 1 sind Peptidverlust und Bildung von Fehlprodukten. Andererseits muss die Schutzgruppe unbedingt

quantitativ abgespalten werden. Falls sich geschützte Peptidketten infolge von Umschichtungen der Matrix bei Quellungsänderungen irreversibel dem Abspaltreagenz entziehen, kann dieses Peptid bei der nächsten Kupplung nicht mehr weiter reagieren. Auch wenn solche Peptidketten nach einem oder mehreren Kupplungsschritten wieder zugänglich werden, bleibt ein Fehler bestehen.

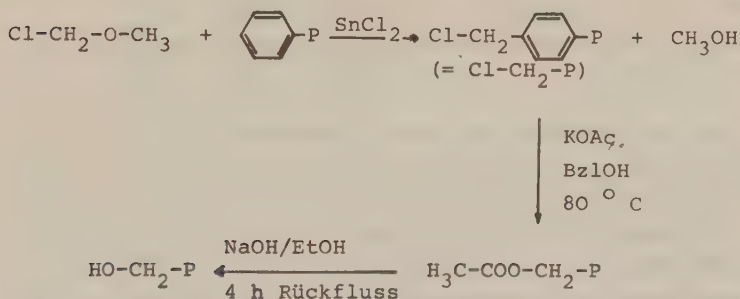
Die jeweiligen Kupplungsausbeuten beeinflussen entscheidend die Qualität einer Festkörpersynthese. Die Höhe der Kupplungsausbeute lässt sich aber nur sehr schwer beurteilen, da - wie im Abschnitt 5.1. ausgeführt wird - keine exakte Umsatzanalytik existiert. Es ist nicht möglich, die Ausbeuten durch Verwendung grosser Überschüsse an Kupplungsagenzien zu steigern, da sonst die Bildung von Nebenprodukten zu stark begünstigt wird.

Zur Vermeidung von Substanzverlusten muss schliesslich das Peptidmaterial vom Harz quantitativ abgelöst werden. Dergestalt synthetisierte Peptide unterscheiden sich wegen der Akkumulierung von Synthesefehlern von Produkten der klassischen Synthese. Die eingangs eingeführte Bezeichnung "Solid-Phase-Peptid" soll diesen Unterschied stets von neuem in Erinnerung rufen.

Verschiedene Techniken mit verschiedenen Festkörpern, Schutzgruppen, Kupplungs- und Abspaltbedingungen sind in der Literatur beschrieben ^{2,3}. In der vorliegenden Arbeit bedienen wir uns der sog. Merrifield-Technik. Diese soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

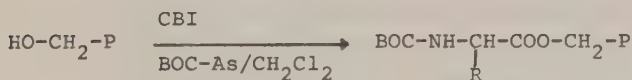
1.1.2. Die Merrifield-Technik

In der Merrifield-Technik wird als Träger ein in allen Lösungsmitteln unlösliches Copolymer aus Polystyrol und 2 % Divinylbenzol verwendet. Die funktionelle Gruppe am Harz wird durch eine Friedel-Crafts-Alkylierung, nachfolgenden S_N2 -Austausch und anschliessende Verseifung eingeführt.



1.1.2.1. Fixierung der N-geschützten Startamino-säure

Als Startamino-säure bezeichnen wir die C-terminale Amino-säure des zu synthetisierenden Peptides der aufzubauen-en Sequenz. Sie wird nach Bodanszky⁴ entsprechend dem nachfolgenden Reaktionsschema auf den Träger gebracht.



CBI= Carbonylbisimidazol

Die Fixierung erfolgt also über eine Benzylesterbindung.

1.1.2.2. Schutzgruppen-Abspaltung

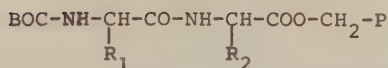
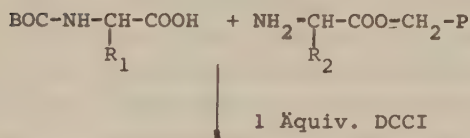
Häufigste Schutzgruppe ist t-Butyl-oxycarbonyl (BOC). Karlsson et al.⁵ beschreiben die Einflüsse des Reaktionsmilieus auf die Abspaltgeschwindigkeit der BOC-Gruppe. Ein Gemisch aus Trifluoressigsäure/ CH_2Cl_2 (1:1/v:v) ist zwar am wirksamsten, jedoch wird durch dieses Reagenz bereits die Benzylesterbindung zwischen Start-aminosäure und Harz in beträchtlichem Ausmass solvolysiert. 4 N HCl/Dioxan scheint das mildeste Abspaltreagenz zu sein, während eine Lösung von 1 N HCl in AcOH in ihrer Wirksamkeit zwischen den beiden ersteren liegt.

Neben der BOC-Gruppe wird auch die o-Nitrophenylsulphenyl-Gruppe zum Schützen von Aminofunktionen verwendet. Diese von Zervas et al.⁶ in die Peptidchemie eingeführte, von Kessler et al.⁷ ins Arsenal der Festkörpersynthese aufgenommene Schutzgruppe kann unter wesentlich milderem Bedingungen abgespalten werden: Kessler verwendet Thioacetamid in Eisessig/Methanol, Najjar et al.⁸ erzielen mit 3-4 Äquivalenten HCl in einer Eisessig-Chloroformmischung innerhalb weniger Minuten quantitative Abspaltung.

1.1.2.3. Kupplung

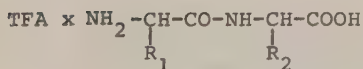
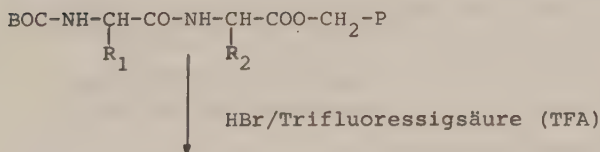
Ein hoher Quellungsgrad des Festkörpers während des Kupplungsschrittes ist eine wichtige Voraussetzung für die Erreichung eines optimalen Umsatzes. Während anfänglich in DMF gekuppelt wurde, verwendet man heute vorwiegend Methylenchlorid, weil in diesem Lösungsmittel eine gute Quellung von Styrol-Polymeren garantiert ist.

Bevorzugtes Kupplungsmittel ist Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI). Man verwendet äquimolare Mengen DCCI und N-geschützte Aminosäure und setzt diese bezogen auf acylierbare Aminogruppen in 3-4 -fachem Überschuss ein.



1.1.2.4. Spaltung der Bindung zwischen Peptid und Harz

Der Resinopeptid-Harz-Komplex ⁺ wird in Trifluoressigsäure vorgequollen. Durch Einleiten von getrocknetem, gasförmigem Bromwasserstoff wird dann die Benzylesterbindung quantitativ gespalten. Auch die meisten Schutzgruppentypen werden unter diesen Bedingungen abgelöst.



⁺ Bezeichnung für ein harzfixiertes Peptid (Fankhauser, Brenner)

1.1.3. Diskussion

Der stufenweise Aufbau eines Peptides an einem Festkörper kann entscheidende Vorteile bringen, je nachdem wie lang das zu synthetisierende Peptid werden soll. Vorteile sind: keine langwierigen, verlustreichen Reinigungsprozeduren; hohe Kupplungsausbeuten, wenn trotz grosser Reagenzüberschüsse Nebenreaktionen vermeidbar sind; schliesslich die Automatisierbarkeit des Syntheseprozesses. Nachteile sind: die praktische Unmöglichkeit der Erzielung quantitativer Reaktionsausbeuten und die dadurch bedingte Entstehung von komplizierten Gemischen; verschiedene, für die Festkörpersynthese charakteristische Nebenreaktionen, die ebenfalls zur Bildung eines Peptidgemisches beitragen.

Ob das gewünschte Peptid aus dem Gemisch isoliert werden kann, ist in erster Linie eine Frage der physikalischen und chemischen Unterschiede der einzelnen Komponenten. Diese können bei kleineren Peptiden (bis ca. 20 Aminosäurereste) genügend gross sein, so dass eine Trennung resp. Reinigung möglich ist. Je grösser das Peptid ist, desto geringer werden die für die Trennbarkeit massgebenden Unterschiede. Die Tatsache, dass nach den einzelnen Kupplungsschritten keine Reinigungsprozeduren durchgeführt werden können, ist bei der Synthese kleinerer Peptide möglicherweise nicht schlimm, bringt die Methode jedoch um die Chance, auch höhermolekulare Peptide in reiner Form zu liefern.

Die Kenntnis von Nebenreaktionen, die den Verlauf einer Festphasensynthese stören, ist für die Beurteilung der Qualität des Produktes von grosser Bedeutung. Verschiedene solcher Störreaktionen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

1.2. Nebenreaktionen bei der Festkörpersynthese: Stand der Literatur

Wie erwähnt, ist ein Solid-Phase-Peptid ein schlecht definiertes Gemisch aus verschiedenen Peptidsorten. Die Kenntnis der Synthesefehler ist für die Beurteilung der Zusammensetzung dieses Gemisches sehr wichtig. Wir wollen daher in den folgenden Abschnitten die bisher in der Festphasensynthese bekannt gewordenen Nebenreaktionen diskutieren.

1.2.1. Auslassung, Kettenabbruch: A-Lückenpeptide und Rumpfpeptide

Wenn die Aminoenden von Peptidketten über eine oder mehrere Synthesestufen für die Kupplungsagenzien unzugänglich sind, oder wenn die Abspaltung der Schutzgruppe erst auf einer späteren Stufe erfolgt, wird der Einbau einer oder mehrerer Aminosäuren übersprungen. Es entstehen sog. A-Lückenpeptide (A bedeutet: durch Auslassung entstanden). Falls jedoch die Peptidketten auch in den nachfolgenden Synthesestufen nicht mehr weiterwachsen (Kettenabbruch), so finden sich im Endprodukt der Synthese sog. Rumpfpeptide. Der Kettenabbruch kann 2 Ursachen haben:

- a) Chemische Veränderung der N-terminalen Aminofunktion (z.B. Alkylierung durch t-Butyl-Carboniumionen, die bei der Schutzgruppenabspaltung entstehen können),
- b) physikalisch bedingte Unzugänglichkeit der Reaktionszentren an den Kettenenden (z.B. durch Umschichtung der Matrix infolge von Quellungsänderung).

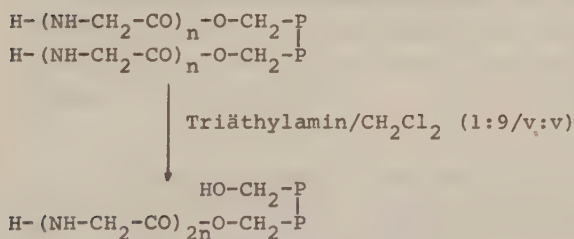
Rumpfpeptide sind statistisch etwa gleichmässig über den gesamten molekularen Bereich verteilt. A-Lückenpeptide im Molekulargewichtsbereich des gewünschten Produktes treten jedoch statistisch viel häufiger auf als solche mit niedrigeren Molekulargewichten. Infolgedessen können Rumpfpeptide auch wesentlich besser abgetrennt werden als Peptide mit Fehlsequenzen. Man wird daher bei einer Synthese bestrebt sein, nach jedem Kupplungsschritt die übriggebliebenen, reaktionsträgen Ketten durch irreversible Blockierung der Aminofunktion auf der einmal erreichten Molekülgrösse zu belassen. Verschiedene Autoren wollen irreversible Blockierung durch Acetylierung der reaktionsträgen Aminofunktion erreicht haben. Allerdings ist es kaum einzusehen, warum diese Stellen nun auf einmal für ein Acetylierungsreagenz zugänglich geworden sein sollen.

Bayer⁹ weist Fehlsequenzen im Solid-Phase-Peptid (Leu-Ala)₆ direkt nach, indem er das Peptid partiell hydrolysiert. Er findet neben den Dipeptiden Leu-Ala und Ala-Leu auch die beiden Dipeptide Leu-Leu und Ala-Ala. Diese beiden können nur aus dem Abbau von Peptiden mit Fehlsequenzen stammen.

1.2.2. Intermolekulare Aminolyse: Pfropf- und Schnittpeptide

Die intermolekulare Aminolyse zwischen zwei Ketten führt je nach Reaktionsort bis zur Längenverdopplung der einen und bis zur völligen Reduktion der anderen Kette. Diese Nebenreaktion ist ein Fall von Transpeptidierung. Das verlängerte Produkt nennen wir Pfropfpeptid, das verkürzte Schnittpetid. Nach Beyermann¹⁰ tritt Kettenverdopplung

während des Neutralisationsschrittes mit Triäthylamin/ CH_2Cl_2 unmittelbar nach der Schutzgruppenabspaltung an Glycyl-, Diglycyl-, Triglycyl- und Tetraglycylharzen auf. Bei Auslassung des Neutralisationsschrittes ist keine Verdopplung zu beobachten. Bei den üblichen Neutralisationszeiten von 10 Minuten wird mit der Bildung von 1 % Tetraglycin aus dem Diglycylpolymer ein Maximum erreicht. Während unter diesen Bedingungen bei Triglycylpolymer nur Spuren von Hexaglycin nachzuweisen sind, werden bei 20 -stündiger Reaktionszeit 5 % Hexaglycin gebildet.



1.2.3. Intramolekulare Aminolyse

Bei intramolekularer Aminolyse gebildete cyclische Produkte fallen ab und lassen auf dem Harz gegebenenfalls ein Schnittpeptid zurück. Aminolyse der C-terminalen Esterbindung führt zu völliger Ablösung der Kette und damit zu einer Ausbeuteverminderung, jedoch nicht zu einer Verschlechterung der Qualität des harzfixierten Materials. An den freigewordenen Hydroxylgruppen können allerdings bei weiteren Kupplungen Fehlpeptide aufgebaut werden, falls

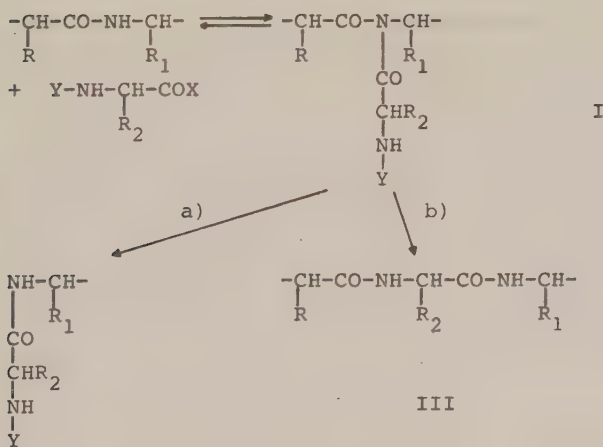
diese Hydroxylgruppen nicht nach jedem Syntheseschritt blockiert werden. Rothe ¹¹ beobachtet bei der Festphasensynthese von Oligo-L-Prolinen auf der Dipeptidstufe eine Abnahme der harzfixierten Aminogruppen um 35 - 40 %. Aus dem Triäthylamin/CH₂Cl₂-Filtrat nach der BOC-Schutzgruppenabspaltung kann Cyclo-di-L-Prolyl dünnsschichtchromatographisch rein isoliert werden. Bei der Synthese von D-Pro-D-Val-L-Pro-Polymer tritt ebenfalls auf der Dipeptidstufe infolge von Diketopiperazin-Bildung ein Ausbeuteverlust von ca. 70 % auf ¹²; die Diketopiperazine bilden sich interessanterweise während des Kupplungsschrittes beim Vorquellen mit BOC-D-Pro-OH. Durch die Zugabe von DCCI wird die Aminolyse verhindert.

1.2.4. Esterspaltung

Eine nicht aminolytische Spaltung der Benzylesterbindung wird von verschiedenen Autoren erwähnt ⁵. In unserer Arbeitsgruppe fanden wir bei der Synthese von BOC-Leu-4,5-³H-Leu-(Leu)₃-1-¹⁴C-Leu-Polymer in den vereinigten Waschfraktionen des letzten Kupplungsschrittes ein ³H-Leucin/¹⁴C-Leucin-Verhältnis von 3 : 1. Dieses Ergebnis beweist einerseits die Existenz der Benzylesterspaltung. Andererseits deutet es auf die Existenz einer Peptidspaltung innerhalb der Kette (intramolekulare Aminolyse oder Backbone-Acylierung ?) hin.

2. Peptidspaltung als Folge von Backbone-Acylierung ?

Eine Peptidbindung muss, damit sie unter den relativ milden Bedingungen einer Peptidsynthese anders als durch Aminolyse gespalten werden kann, normalerweise aktiviert werden. Die unter den gegebenen Umständen einzige mögliche Aktivierung ist die Backbone-Acylierung (BA) und somit die Bildung von Diacylimiden (I). Diese Diacylimide sind sehr instabil und können je nach Reaktionsmilieu zwei Folgereaktionen eingehen: a) Peptidspaltung, b) Aminoacyleinlagerung (AAE) (siehe Reaktionsschema). Die Spaltung einer Peptidbindung führt zu kleineren Fragmentpeptiden, die wir als Spaltpeptide (abgelöster Anteil) und Lückenpeptide (II) (harzfixierter Anteil) bezeichnen. Die AAE führt zu sog. Einlagerungspeptiden (III).



II

III

3. Problemstellung

Wegen der Entstehungsmöglichkeit durch Auslassung ist der Nachweis von Lückenpeptiden noch kein Beweis, sondern nur ein Hinweis auf das Auftreten von Backbone-Acylierungen. Erst der experimentelle Nachweis von Aminoacyleinlagerungen im Verlaufe einer Merrifield-Synthese erlaubt, die Backbone-Acylierung unter die Fehlerquellen bei Merrifield-Synthesen einzureihen.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren der Nachweis der Backbone-Acylierung durch Nachweis von Aminoacyleinlagerungen am Beispiel von Oligo-Leucinen.

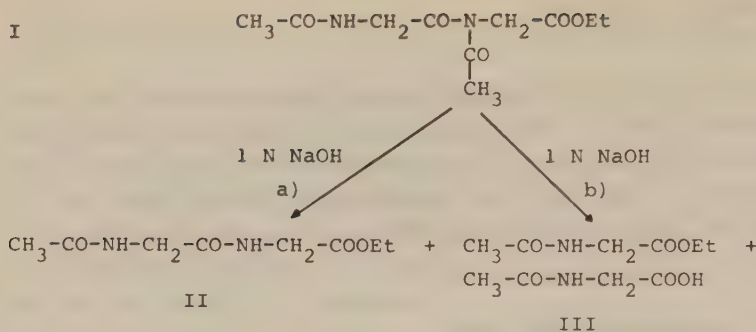
4. Theoretischer Teil

Was ist über die Bildungsweise und Reaktionen der Diacylimide bekannt? Was sind hieraus für Schlüsse hinsichtlich BA und deren Folgereaktionen bei Peptidsynthesen zu ziehen? Welche Folgerungen ergeben sich daraus für die Merrifield-Synthese?

4.1. Chemie der Diacylimide

Die gezielte Synthese von Diacylimiden verläuft nur unter sehr drastischen Bedingungen^{13,14,15,16,17}: Amine resp. Amide werden im allgemeinen mit Anhydriden oder Säurechloriden am Rückfluss gekocht. Selbst sperrige Amine, wie z.B. Isopropylamin, bilden mit Essigsäureanhydrid unter diesen Bedingungen die Diacetylverbindung.

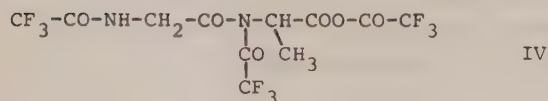
Das erste in der Literatur beschriebene Diacylimid aus der Peptidreihe scheint das Produkt der Alkoholyse von Diacetyldioxopiperazin zu sein¹⁸. Bei dieser Reaktion bildet sich in Gegenwart von Arginin als Katalysator als Hauptprodukt das Diacetylderivat (I). Die leicht zu isolierende Verbindung kann einen Acylrest auf ein Lösungsmittelmolekül übertragen. Die Folgen dieser Solvolyse sind entweder Regeneration des Amides (a) oder Peptidspaltung (b). Bei der Solvolyse von I mit 1 Mol NaOH können 12 % Monoacetylglycylglycinäthylester (II) und 70 % Acetylglycin (III) isoliert werden¹⁸.



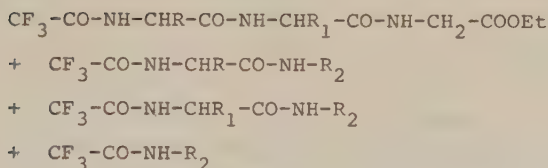
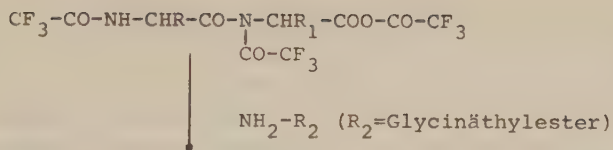
Der Zerfall verläuft in diesem Fall deutlich zugunsten der Peptidspaltung (b).

Das Diacetylderivat (I) ist in neutralem, wässrigen Milieu nicht sehr hydrolyseempfindlich, denn selbst nach 1/2 -stündigem Kochen in Wasser wird zur Neutralisation des Hydrolysates nur etwa 1/4 Äquivalent Lauge verbraucht.

Weygand et al. ^{19,20} setzen Glycyl-DL-Alanin mit einem Überschuss an Trifluoressigsäureanhydrid in Trifluoressigsäure zu N, N'-(Trifluoracetyl)glycyl-DL-Alanin-trifluoressigsäureanhydrid (IV) um.

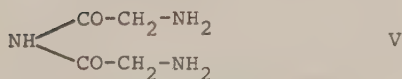


In Tetrahydrofuran wird das Diacylimid mit Glycin-äthylester in wenigen Minuten bei Zimmertemperatur gespalten. Tatsächlich sind im Hydrolysat von IV sämtliche theoretisch zu erwartenden Hydrolysen-resp. Spaltprodukte papierchromatographisch nachweisbar (nachfolgendes Schema).



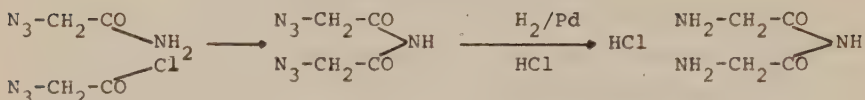
Weiter liefert die Behandlung von Leu-Gly-Gly mit Tri-
fluoressigsäureanhydrid und nachfolgender Hydrolyse des
rohen Reaktionsproduktes 3,6 % Leu und Gly-Gly neben
7,0 % Leu-Gly und Gly. Der Grund für diese relativ nied-
rigen Ausbeuten an Spaltprodukten kann entweder eine
nur teilweise erfolgte Bildung der Diacylimide oder
aber eine bevorzugte Solvolyse derselben im Sinne der
Peptidregeneration sein.

Di-(aminoacetyl)-imid (V) ist wegen seiner Empfindlich-
keit gegenüber Basen nicht durch direkten Umsatz von
Di-(chloracet)-imid mit wässrigem Amoniak zugänglich,
wie in früheren Arbeiten berichtet wird.

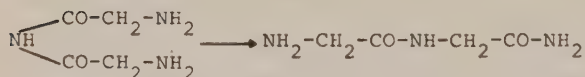


Wieland et al. ^{21,22} schlagen vielmehr einen indirekten
Syntheseweg vor: Azidoacetamid wird mit Azidoacetylchlorid

umgesetzt. Das Produkt wird mit H_2/Pd in salzsaurer Lösung reduziert.



Wie wir im Falle der amidacylierten Dipeptide (I und IV) gesehen haben, können Diacylimide auf Grund ihrer energiereichen Struktur einen ihrer Acylreste leicht auf nukleophile Akzeptoren übertragen (solvolytische Reaktion). Da sich die Aminofunktion des Di-(aminoacetyl)-imides auf Grund der günstigen räumlichen Anordnung gut als Akzeptor eignet, lagert dieses Molekül in einer schnellen intramolekularen Reaktion zum Dipeptidamid um.



Wir unterscheiden also drei Folgereaktionen der Diacylimide.

4.2. Regeneration

Backbone-acylierte Peptide können die Aminoacylgruppe wieder abwerfen. Dies wäre die Rückreaktion der Backbone-acylierung. Da wir wiederum das Ausgangsprodukt erhalten, interessiert diese Art von Imidspaltung für unsere weiteren Untersuchungen nicht.

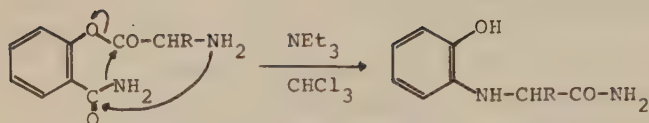
4.3. Bildung von B-Lückenpeptiden

Backbone-acylierte Peptide können statt der eingeführten Aminoacylgruppen den anderen Acylrest vom diacylierten Stickstoff abwerfen: Bildung von sog. B-Lückenpeptiden. Wir sprechen hier von B-Lückenpeptiden, weil die Sequenzen solcher Produkte im Gegensatz zu Schnittpeptiden (1.2.2.) eine Lücke aufweisen: aminoendständig steht hier genau die Aminosäure, die auch im Normalfall aminoendständig ist (B bedeutet: durch BA entstanden).

Mit den B-Lückenpeptiden identische, sog. A-Lückenpeptide können durch einfache und wiederholte Auslassung entstehen (vgl. 1.2.1.). Abgesehen von der Schwierigkeit ihrer analytischen Unterscheidung von Schnitt- und Rumpfpeptiden kann also das Auftreten von Lückenpeptiden nicht als Hinweis für vorausgegangene BA bewertet werden. Wenn andere Peptidspaltungen, z.B. solche infolge von Aminolyse (1.2.3.) und das Vorhandensein von mit den B-Lückenpeptiden identischen A-Lückenpeptiden auf der Basis exakter Analytik ausgeschlossen, resp. kontrolliert werden können, so wäre der Nachweis dieser Lückenpeptide ein Beweis für die Existenz einer BA. Diese Lückenpeptide müssten allerdings aus einem Gemisch verschiedener Peptidsorten isoliert werden - ein hoffnungsloses Unterfangen, wie unten noch darzulegen sein wird.

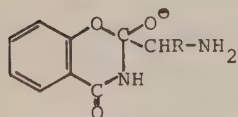
4.4. Die Aminoacyleinlagerung (AAE)

Die AAE wurde von Brenner et al. ²⁴ an O-aminoacylierten Derivaten der Salicylsäure entdeckt.



Der Aminoacylrest schiebt sich zwischen die Carboxyl- und Amid-Gruppe ein. Die Reaktion ist nach wenigen Minuten beendet.

Versuche an analogen, aliphatischen Systemen zeigen unter den obigen Bedingungen keine Einlagerungsbereitschaft. Erst wesentlich stärkere Basen (z.B. Kalium-*t*-butylat) lassen das Produkt quantitativ entstehen. Neuere mechanistische Studien lassen vermuten, dass der entscheidende Schritt für eine erfolgreiche AAE die erfolgreiche Bildung eines Diacylimides ist ⁴⁸.

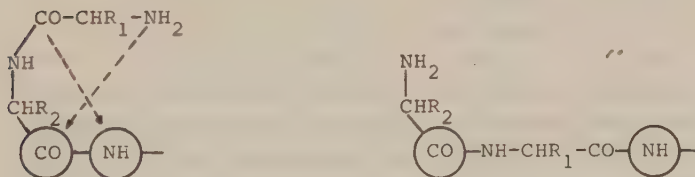


Die Bildung dieses cyclischen Anions ist bei den Salicylsäurederivaten sterisch aussergewöhnlich begünstigt. Bei aliphatischen Derivaten ist infolge der freien Drehbarkeit der C-C Bindung diese räumliche Begünstigung nicht mehr gegeben.

Für das Eintreten einer AAE nach obigem Schema müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein.

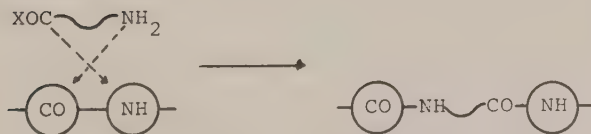
1. Die Aminosäure, die eingelagert werden soll, muss durch Veresterung aktiviert sein.
2. Die veresterte Aminosäure muss in die Nähe einer Peptidbindung gebracht werden (durch Fixierung im selben Molekül).
3. Als Katalysator für die Umlagerung zum Diacylamid ist eine Base notwendig.

Neben der Aktivierung der einzulagernden Aminosäure durch Veresterung kann auch bereits die "Aktivierung" in der Amidbindung die Aminoacyleinlagerung begünstigen:



Tatsächlich kann in einer Lösung von Glycyl-Phenylalaninamid und Kalium-t-butylat als Isomerisierungsprodukt Phenylalanyl-Glycinamid nachgewiesen werden.

Nach Brenner ²⁵ muss auch der allgemeinste Fall der Aminoacyleinlagerung, nämlich die Einlagerung einer aktivierten Aminosäure in eine beliebige Peptidbindung auf dem Wege über BA grundsätzlich möglich sein.

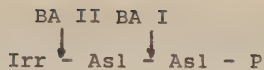


In der Literatur sind zwei Fälle von Peptidsynthesen durch modifizierte Aminoacyleinlagerung beschrieben. So erhält man z.B. durch Umsatz von Pht-L-Phe-Gly-OEt mit N_3-CH_2-COCl und anschliessender Reduktion der Azidogruppe das Tripeptid Pht-L-Phe-Gly-Gly-OEt²⁶.

Davies²⁷ aktiviert die Peptidbindung von Dipeptiden mit Trimethylchlorsilan und setzt das entstandene Produkt mit dem Säurechlorid einer Benzyloxycarbonyl-Aminosäure um. Nach Schutzgruppenabspaltung und Neutralisation bildet sich das Tripeptid in hoher Ausbeute. Bemerkenswert ist, dass nur eine Amidbindung (nämlich die eigentliche Peptidbindung) acyliert wird. Diacylderivate und entsprechende Tetrapeptide können nur in Spuren nachgewiesen werden.

Die Isolierung von Merrifield-Einlagerungspeptiden stösst auf dieselben Schwierigkeiten wie die Isolierung von Lückenpeptiden, da beide in komplexen Peptidgemischen auftreten. Die Trennschwierigkeiten seien an einem Modellfall illustriert. Ein irreversibel N-geschütztes Resinopeptid Irr-As1-As1-P werde unter Kupplungsbedingungen mit einer reversibel N-geschützten Fremdaminosäure⁺ Sch-As2-OH behandelt. Bei diesem denkbar einfachsten Beispiel befindet sich nach der Abspaltung von Sch bereits ein Gemisch von mindestens 5 Peptidsorten und 2 Aminosäuren auf dem Trägerharz und zwar im allgemeinen in einem für die Trennung äusserst ungünstigen Konzentrationsverhältnis:

⁺ Unter Fremdaminosäure verstehen wir eine nicht im Substratpeptid enthaltene Aminosäure.



Irr-Asl-Asl-P	Ursprungspeptid (viel)
As2-Asl-P	B-Lückenpeptid nach BA I (wenig), A-Lückenpeptid
As2-Asl-Asl-P	B-Lückenpeptid nach BA II (wenig)
Irr-Asl-As2-Asl-P	AAE nach BA I (wenig)
Irr-As2-Asl-Asl-P	AAE nach BA II (wenig)
Asl-P	Schnitt durch Aminolyse, Acy- lierung von HO-P, Rumpfpeptid
Irr-Asl-P	Acylierung von HO-P
As2-P	Acylierung von HO-P

Die Isolierung von Einlagerungs- oder B-Lückenpeptiden ist bei höhermolekularen Substraten wegen der noch komplexeren Zusammensetzung des Resinopeptides und der Vielzahl der Nebenreaktionen vollkommen ausgeschlossen. Somit ist an einen Nachweis der Backbone-Acylierung durch Isolierung von B-Lückenpeptiden oder Einlagerungspeptiden nicht zu denken.

4.5. Nachweisverfahren für Einlagerungspeptide und BA

Durch das im Schema auf S. 24 angegebene Verfahren kann die Isolierung der Einlagerungspeptide zum Zwecke des BA-Nachweises umgangen werden. Ein Resinopeptid wird so vollständig als möglich benzoyleiert. Mit 100 % -iger Benzoyleierung kann nicht gerechnet werden - ein Umstand, den wir zur Kenntnis nehmen müssen, und dem im folgenden strategisch Rechnung getragen wird. Das benzoyleierte Resinopeptid (1) wird nun unter Kupplungsbedingungen mit einer Fremdaminosäure

BOC-NH-CHR'-COOH nachbehandelt (Simulierkupplung). Nach der Simulierkupplungsprozedur können beide Peptidarten - benzoyleierte und nicht benzoyleierte - Fremdaminosäure enthalten (6,7). Wir dürfen mit Sicherheit behaupten, dass die Fremdaminosäure im Benzoylpeptid ein Beweis für die Existenz der BA/AAE ist. Eine andere Herkunft von Benzoyl-Peptid mit eingelagerter Fremdaminosäure als durch Backbone-Acylierung ist undenkbar. Das Vorhandensein von Fremdaminosäure im ungeschützten Peptid kann durch deren Aufkuppeln auf das freie Aminoende zustande gekommen sein. Daher muss nach Abspaltung des Peptidmaterials vom Harz freies und geschütztes Peptid absolut zuverlässig getrennt werden. Gelingt dies, so ist nach der Totalhydrolyse des Benzoylpeptides die gefundene Menge an Fremdaminosäure ein eindeutiges Mass für das Auftreten von BA/AAE. Diese Nachweisprozedur bietet uns folgende Vorteile:

1. Einlagerungsprodukte können durch beliebige Wiederholung von Simulierkupplungen angereichert werden.
2. Produkte von störenden Nebenreaktionen, wie sie durch Aufkuppeln der Fremdaminosäure auf ungeschütztes Peptid oder Schnittpeptid entstehen würden, können leicht als freie Peptide abgetrennt werden.
3. Die verschiedenartigen Einlagerungsprodukte müssen nicht einzeln isoliert und nachgewiesen werden. Die eingelagerte Fremdaminosäure kann summarisch (unabhängig von der Einlagerungsstelle) im Totalhydrolysat des abgetrennten Benzoylpeptides analysiert werden.
4. Eine exakte Umsatzanalytik ist nicht erforderlich.

Mitchell und Roeske ²⁸ sehen in der Bildung von Tetraglycin bei der SP-Synthese von Triglycinpolymer einen Beweis für die Existenz der Backbone-Acylierung mit nachfolgender Aminoacyl-einlagerung. Da Tetraglycin auch infolge von Transpeptidierung ¹⁰ entstanden sein kann, ist diese "Beweisführung" als wertlos zu betrachten.

5. Harzanalytik

5.1. Analytische Zielsetzung

Der iterative Charakter der Festphasensynthese bringt es mit sich, dass man den Syntheseverlauf im Prinzip durch analytische Erfassung aller freien Aminogruppen vor und nach jedem Reaktionsschritt, welcher die Zahl dieser Gruppen verändert, verfolgen kann. Wenn mechanische und chemische Verluste an Festphase vermieden werden, so bleibt die Anzahl der Kettenenden während der Gesamtdauer einer Synthese konstant. Tragen diese Enden Schutzgruppen, so liegen im Prinzip keine freien Aminogruppen vor. Sind die Schutzgruppen abgespalten, so sieht man sich während der ganzen Dauer der Synthese einer konstanten Anzahl von NH_2 -Gruppen gegenüber. Was im Lauf der Synthese zunimmt, ist die Masse der Festphase, und damit nimmt die Aminogruppenbeladung pro Gewichtseinheit ab. Wir definieren:

1. Die Totalbeladung als Gesamtmenge von basischen Gruppen, welche in der Gesamtmenge eines Resinopeptides erfassbar ist. "Entschützt" ist das Resinopeptid jedesmal nach erfolgter Abspaltung der Aminoschutzgruppen der im vorhergehenden Kupplungsschritt aufgebrauchten Aminosäure.
2. Als Restbeladung die Gesamtmenge an Aminogruppen, welche in der Gesamtmenge eines geschützten Resinopeptides nachweisbar ist. Geschützt ist das Peptid nach jedem beendeten Kupplungsschritt. Sind in diesem Zustand noch freie Aminogruppen vorhanden, so sind das restliche Aminogruppen,

die im Kupplungsschritt übrig geblieben sind. Daher die Bezeichnung Restbeladung als Mass für ihre Anzahl.

Bei idealem Reaktionsverlauf bleibt die Gesamtbeladung auf dem konstanten Anfangswert und die Restbeladung bei Null. Abweichungen von dieser Norm vermitteln unmittelbar Einblicke in das tatsächliche Reaktionsgeschehen und den zu erwartenden Qualitätsgrad eines Festphasenproduktes. Es ist Aufgabe der Analytik, die entsprechenden Daten zu liefern. Das Problem erscheint auf den ersten Blick einfach, erweist sich aber in der Praxis als äusserordentlich schwierig.

Zur Illustration zitiere ich aus "Need for Solid Phase Thinking in Solid Phase Synthesis" (Fankhauser/Brenner ⁴²):

" Classical peptide synthesis is made up of repetitive cycles of unit operations. Each cycle and each unit of the whole process is at least in principle based on a known quantity of a pure intermediate. With respect to information these intermediates represent well defined and equivalent levels. Analytically we deal with separation and characterisation and with mass relations based on simple balance readings.

SP synthesis is made up of the same cycles and units, but now these latter represent a series of consecutive steps. The task of analysis now is characterisation of every single step by furnishing information on the effected amount of change. The goal is a maximum of knowledge about the state of the completed series. Since data on every step are based on data of the preceding step, because these latter define the respective starting situation, we cannot afford errors. Otherwise, relative errors in

consecutive steps being additive, our information falls rapidly to an insignificant level.

A routine analytical method is considered to be satisfactory, if the standard deviation amounts to about 1 % of the difference between blank and sample readings. As a rule, this condition is met only within a certain range of sample size. Outside, especially below a certain limit, relative errors increase. But the order of magnitude of the absolute error remains rather constant, depending largely on the reproducibility of the blank reading. Since in SP analysis we are always and exclusively interested in differences, a small absolute error, though relatively large, at a lower sample level (for example residual aminogroups after coupling) may practically vanish as compared to a large absolute error, though relatively small, at the upper sample level (for example total aminogroups after deblocking). A simple, rapid and cheap method with small absolute error at the upper level and not very sensitive at the lower one is preferable to a sophisticated method with a larger absolute error at the upper and a much smaller absolute error at the lower level. The reader is invited in this context to compare Dorman's titration of aminogroups in its original Py. HCl/DMF/ NEt_3 -version (Dorman, 1969) with Esko's 2-hydroxy-1-naphthaldehyd procedure (Esko et al., 1968; Karlsson et al., 1970). It is quite true that standard deviations of the order of 1 % + 1 % = 2 % and more are too large for an efficient step control in SP synthesis, where step yields are supposed to approach the 100 % limit. But the answer to the problem cannot be found in improvement on a single one of the two sample levels under considerations. If it is agreed that satisfaction on both sides is perhaps beyond practical

possibility, the answer must come from an approach which avoids the concept of lower and upper sample levels all together. Instead of sometimes determining what is there after a step (e.g. deblocking), and sometimes what is left after a step (e.g. coupling) we should concentrate our full attention to the latter task. That one is more rewarding, because absolute errors in trace analysis are small by definition, and because too large relative errors are often susceptible to be dealt with by due sophistication. Our conclusion then is to propose the invention of blocking groups which are directly accessible to quantitative analysis, thus opening the way to a direct estimation after deblocking of residual blocking groups, as an analogue to direkt estimation after coupling of residual aminogroups. The same reasoning applies evidently to any other type of group analysis to be used in improving SP synthesis control. In composition analysis for example, when estimating relative and absolute aminoacid content of the resinopeptide, we are always by the very nature of the problem at the upper sample level and therefor have to accept large absolute errors, even in the optimal case of standard deviations around 2 %."

Verfolgung der Reaktion auf dem Trägerharz		Verfolgung der Reaktion in der Lösung	
Direkte Messung auf dem Harz	Vollständiger Abbau des Harzes (z.B. Verbrennung)	Indirekte Verfolgung (Messung von Überschußen)	Direkte Verfolgung (Messung von Reaktionsprodukten)
			Ohne Hilfsreaktion
Schutzgruppen und Blockierungsreagenzien mit Neutronen-aktivierbaren Heteroelementen. ●	N-Gehalt bei Erstbeladung. ▲ ! Schutzgruppen mit Tracer- oder Heteroelement-Markierung.	Farbige oder markierte Schutzgruppen. ▲ Tracer-Blockierung nicht umgesetzter Aminogruppen.	Chloridtitration bei Freisetzung von Hydrochloriden. ▲ Bestimmung farbiger oder markierter Reaktionskomponenten. ▲ Thermotitration.
			Mit 1 Hilfsreaktion
Acylierung etc. mit Neutronen-aktivierbaren Heteroelementhaltigen Reagenzien. ● Spin-labeling.	Tracer-Acylierung. ▲	Umsatz mit geringem Überschuß hochreaktiver Reagenzien. (Bsp.: Stark UV-absorbierende Aldehyde ●)	Ablösung der Beladung: Aminosäure- und Peptidanalyse. ▲ Ninhydrinreaktion. ▲ Titrationsen. ▲
			Mit Sequenz von Hilfsreaktionen
		Einführung z.B. oxidierbarer Blockierungsgruppen und nachfolgende indirekte Titration.	Pyridin-Hydrochlorid. ▲ Hydroxynaphtaldehyd. ▲ Edman-Abbau. ▲

▲ bereits in der Literatur beschrieben

● eigene Arbeiten bisher erfolglos

▲ in vorliegender Arbeit beschrieben

● Vorversuche im Gange

5.2. Methodik

Eine analytische Methode muss folgenden Anforderungen genügen, damit sie als zuverlässig gelten kann:

1. Vermeidung systematischer Fehler
2. Hinreichende Reproduzierbarkeit

Die 1. Forderung kann kaum eingehalten werden, da keine einwandfreien analytischen Standards zur Verfügung stehen. Daher ist die parallele Anwendung mehrerer analytischer Methoden erforderlich. Diese müssen in sich widerspruchsfreie analytische Daten liefern. Grundsätzlich denkbare Möglichkeiten zur Verfolgung von Festkörpersynthesen sind in der Tabelle auf S. 30 zusammengestellt. Einige davon werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.2.1. Indirekte Umsatzanalytik: Zwischenschaltung einer Hilfsreaktion

5.2.1.1. Umsatzanalytik über Säure/Base-Austausch

Grundsätzlich aber mit der im Zitat auf Seite 27 gemachten Einschränkung können für Total- und Restbeladungsbestimmung identische Methoden angewendet werden.

HCl-Elutionsmethode

Ursprünglich wurde von Merrifield das bei der Schutzgruppenabspaltung mit HBr/Eisessig entstandene Hydrobromid mit Triäthylamin/Dimethylformamid neutralisiert und im Filtrat das Bromid potentiometrisch titriert. Bei Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit 4 N HCl in Dioxan erhält man das Hydrochlorid, das in analoger Weise bestimmt werden kann.

Das von vielen Autoren vorgeschlagene Neutralisierungsreagenz Triäthylamin/ CHCl_3 eignet sich wegen des hohen und schwankenden Chlorid-Blindwertes schlecht. Um einen Chlorid-Blindwert auszuschalten, jedoch eine gute Quellung zu garantieren, verwenden wir in den späteren Versuchen zum Neutralisieren des Hydrochlorides eine Mischung von Triäthylamin/t-BuOH/Dioxan (1:6:3/v:v:v).

Pyridinhydrochlorid-Methode nach Dorman ²⁹

Die nach einer Kupplung nicht umgesetzten, freien Aminogruppen (Restbeladung) können wegen der Säureempfindlichkeit der BOC-Schutzgruppe nicht mit dem Abspaltreagenz direkt in das Hydrochlorid übergeführt werden. Vielmehr werden diese freien Aminogruppen mit Pyridinhydrochlorid beladen. Die Freisetzung der Aminogruppen und die Titration des Chlorides kann nach der oben beschriebenen Weise erfolgen. Bei einem Vergleich der beiden Bestimmungsmethoden an partiell benzyliertem Hexaleucin-Polymer liegen die Beladungswerte der HCl-Methode höher als die der Pyridinhydrochlorid-Methode (HCl-Methode: 20 % freies Amin, Pyridinhydrochlorid-Methode: 13 % freies Amin, beides bezogen auf Totalbeladung). Die Reproduzierbarkeiten der beiden Methoden werden in 5.1.2.1.4. verglichen.

5.2.1.2. Umsatzanalytik über Aldehyd-Austausch (Schiff'sche Basen)

Das freie Resinopeptid wird mit 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd nach Esko ³⁰ zur Schiff'schen Base umgesetzt. Nach Auswaschen des überschüssigen Reagenz wird mit einem Überschuss an Benzylamin in CH_2Cl_2 umaminiert. Die neue Schiff'sche Base, gebildet aus Benzylamin und 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd, kann im Eluat spektroskopisch ausgemessen werden. Die Stabilität der Benzylamin/Methylenchlorid-Lösung

ist ausreichend, d.h. die Extinktion nimmt nach 24 -stündigem Stehen im verschlossenen Messkolben nur um etwa 2 % zu. Allerdings bilden sich bereits nach 2 -tägigem Stehen Benzylaminhydrochlorid-Kristalle. Ein Blindwert für die Naphtaldehyd-Retention ist nicht bestimmbar, weil hierfür kein Testmaterial existiert: die für einen allfälligen Blindwert massgebenden NH_2 -unabhängigen adsorptiven Eigenschaften der Festphase hängen nämlich von Art und Menge des Peptidanteils im Resinopeptid-Matrix-Komplex ab und sind somit von Fall zu Fall verschieden. Beizufügen wäre, dass nach unseren Erfahrungen am unbeladenen Copolymer keine Naphtaldehyd-Retention feststellbar ist.

Bei Verwendung einer Benzylamin/Dioxan-Lösung zur Umaminierung sind die gefundenen Beladungswerte kleiner, was auf unvollständige Reaktion hinweist.

Da die Esko-Methode sehr zeitraubend ist, haben wir versuchsweise das freie Resinopeptid mit einem definierten Überschuss an verschiedenen Aldehyden umgesetzt und die überstehende Lösung photometrisch ausgemessen. Die Differenz zwischen so gefundener und eingewogener Aldehydmenge sollte im Idealfall mit dem Anteil an freiem Amin auf dem Harz identisch sein. Durch diese vereinfachte Analysenprozedur könnte die Umaminierungsreaktion umgangen werden. Leider sind unsere Erfahrungen mit Naphtaldehyd, 4-Dimethylaminobenzaldehyd, Anisaldehyd und Zimtaldehyd negativ, da die Ergebnisse zumeist sehr schlecht reproduzierbar waren.

5.2.1.3. Umsatzanalytik mit markierten Acylierungsreagenzien

Markley et al.³¹ kommen bei einem Vergleich verschiedener Acylierungsmittel zum Ergebnis, dass N-Acetylimidazol freie Aminogruppen sehr wirksam blockiert. Diese Erkenntnis führte zu einer in unserem Laboratorium entwickelten neuen Analysenmethode (Fankhauser). Resinopeptide werden mit einem Überschuss an ^{14}C -Acetimidazol oder mit ^{14}C - Ac_2O umgesetzt. Nach gründlichem Auswaschen des Überschusses werden die Proben verbrannt und deren Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler ausgemessen. Mittels einer Eichkurve lässt sich die auf dem Harz fixierte Menge Acylierungsmittel und damit auch die Anzahl freier Aminogruppen ermitteln. Zur Acylierung werden eingesetzt:

- a) ^{14}C -Acetanhydrid
- b) ein Gemisch aus ^{14}C -AcOH und 1,3 Äquivalenten Carbonylbisimidazol
- c) äquimolare Mengen an ^{14}C -AcOH und Carbonylbisimidazol
- d) ein Gemisch aus ^{14}C -AcOH und 0,7 Äquivalenten Carbonylbisimidazol.

Es zeigt sich, dass das Acylierungsgemisch b) nicht mehr wirksam ist, indem es nur noch 2 % der totalen Menge an Aminogruppen zu acylieren vermag.

5.2.1.4. Varianten

Zum Säure-Basen-Austausch ist auch die Verwendung von Pikrinsäure und Diisopropyläthylamin³² vorgeschlagen worden. Als mittlere Abweichung vom Mittelwert wird

1,1 % angegeben.

Eine weitere Möglichkeit der Umsatzanalyse mit radioaktiven Substanzen ist der Umsatz mit markierten Schutzgruppen oder ^{14}C -Phenylisothiocyanat ³³.

Bayer ³⁴ spaltet das Peptid vom Harz ab, trifluoracetyliert und misst die Peakflächen der ^{19}F -NMR-Spektren der resultierenden TFA-Peptide aus. Eine Kombination von Edman-Abbau und massenspektroskopischer Verdünnungsanalyse wird von Weygand et al. ³⁵ vorgeschlagen.

Ein sehr nützlicher, qualitativer Test auf freie Amino-
gruppen ist die Reaktion mit Ninhydrin nach Kaiser et al. ³⁶.
Sie kann in wenigen Minuten im Mikromasstab durchgeführt werden.

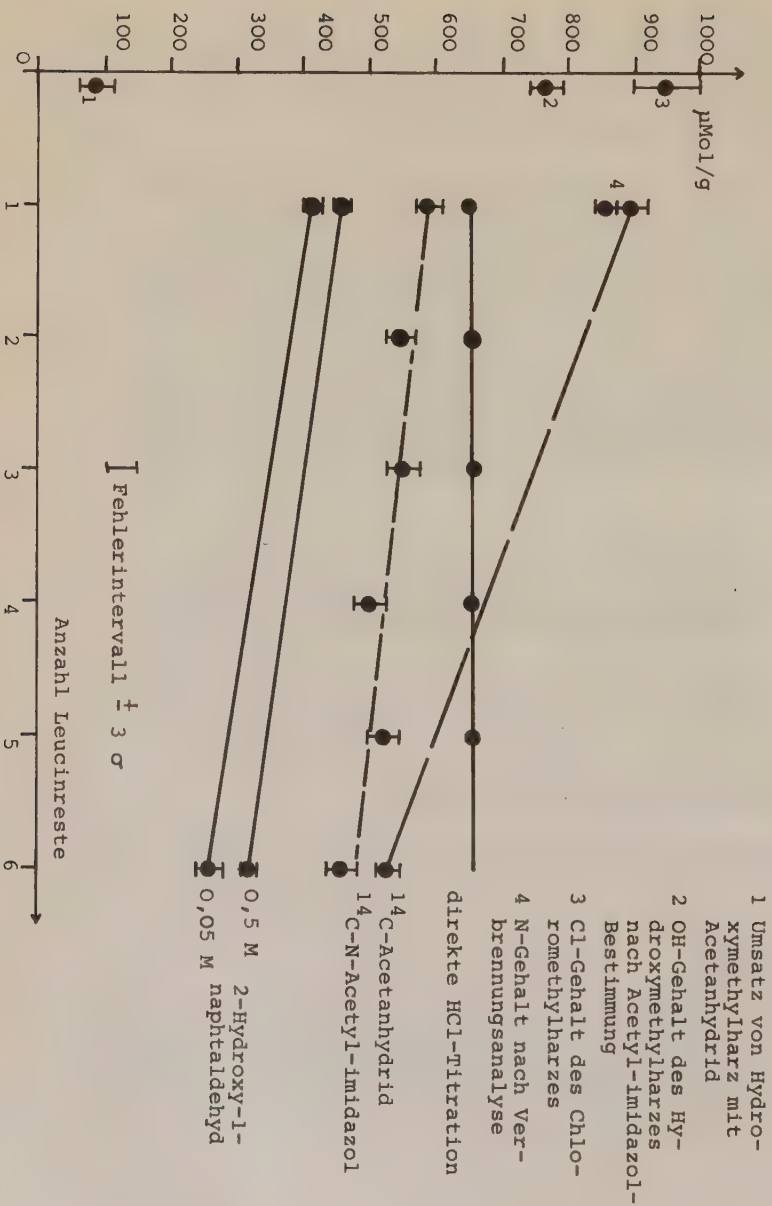
5.2.1.5. Vergleich der Methoden 5.2.1.1. bis 5.2.1.3. an Oligoleucin-Polymeren((Leu)_n-P, n = 1-6) ⁴⁵

An harzfixierten Oligoleucinen der Reihe n = 1-6 sollen die 4 beschriebenen Methoden miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden graphischen Darstellung einander gegenübergestellt.

Bestimmung der Totalbeladungen nach der Acetimidazol- und der Hydroxinaphtaldehyd-Methode liefert kleinere Beladungswerte als die Bestimmung nach der HCl-Elutionsmethode. Erstere nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. Hingegen erhält man bei der Bestimmung der Totalbeladung von Leu-P mit ^{14}C -Ac₂O wesentlich höhere Werte. Die Ursache hierfür kann eine Diacylierung von Aminogruppen sein. Schliesslich liegen die Beladungswerte der Hydroxinaphtaldehyd-Methode erheblich unter allen anderen Werten. Sie sind ausserdem

Totale Aminogruppenbelastung pro g Grundpolymer

Im Verlaufe einer Festkörpersynthese von Hexaleucin
(nach Abspaltung der BOC-Gruppen mit Nioxan/HCl 4 N)

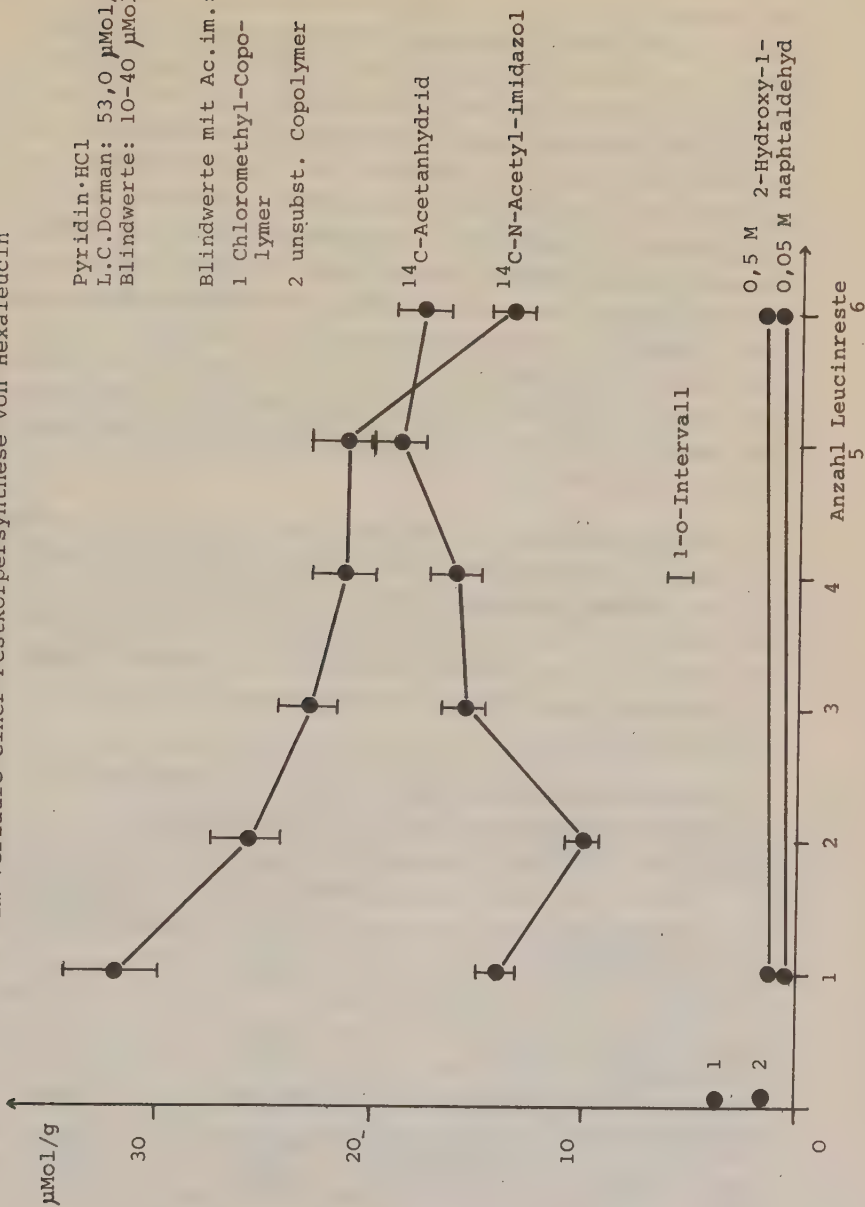


Nicht umgesetzte Aminogruppen

im Verlaufe einer Festkörpersynthese von Hexaleucin

Pyridin·HCl
L.C.Dorman: 53,0 $\mu\text{mol/g}$
Blindwerte: 10-40 $\mu\text{mol/g}$

Blindwerte mit Ac.im.:
1 Chloromethyl-Copolymer
2 unsubst. Copolymer



0,5 M 2-Hydroxy-1-
0,05 M naphthaldehyd

der Konzentration an Hydroxinaphtaldehyd proportional, was auf einen unvollständigen Reaktionsablauf schliessen lässt. Die Abnahme der Totalbeladung um 25 % während des Syntheseverlaufes nach der Acetimidazol- und der Hydroxinaphtaldehyd-Methode kann nicht durch Substanzverlust via Esterspaltung erklärt werden. Auch unvollständige Deblockierung kann auf Basis der HCl-Elution (5.1.2.1.), unvollständige Kupplung nach dem Ergebnis über die Restbeladung ausgeschlossen werden. Eine plausible Erklärung für die Abnahme der Totalbeladung laut Hydroxinaphtaldehyd- und ^{14}C -Methode bietet die Annahme, dass die protonisierbare Zahl der Aminogruppen auf dem Harz zwar gleich bleibt, dass aber ein zunehmender Teil derselben im Syntheseverlauf weder für Acylierung noch für eine Reaktion mit dem Aldehyd zugänglich ist.

Auch die Restbeladungen sind nach den verschiedenen Methoden verschieden. Die gegenseitige Annäherung der Acetimidazol- und der Acetanhydridwerte während des Syntheseverlaufes ist vermutlich auf ein allmähliches Verschwinden restlicher, freier Hydroximethylgruppen am Harz zurückzuführen. Ac_2O acyliert Hydroximethylgruppen wesentlich schlechter als Acetimidazol.

Reproduzierbarkeit einiger Methoden zur Bestimmung der Amin-Beladung auf Polystyrol/DVB-Harzen

Methode:	Ansatzgrösse:	Erfasster Beladungsbereich (uMol/g):	berechnete Standard-Abweichung(%):
HCl-Elution mit $\text{NEt}_3/\text{CHCl}_3$ und potentiomet. Cl^- -Titrat.	30 g	400-900	0,5
	100 mg	400-900	1,6
Pyridin-HCl nach Dorman	1 g	50-100	5-10
2-Hydroxi-1-naphtaldehyd nach Esko	1-4 mg	400-900	bis 3
	10-20 mg	0,5-2	10-20
Salicylaldehyd	10-20 mg	400-900	5

5.2.2. Direkte Umsatzanalytik

Die Umgehung einer Hilfsreaktion stellt in jedem Fall eine Zeitersparnis dar. Es ist ja nicht nur die Reaktion auszuführen, sondern es muss anschliessend in mehr oder weniger komplizierter Weise die Umsatzmenge bestimmt werden. Hierzu sind Waschprozesse erforderlich, die ihrerseits auch wieder kontrolliert werden müssen.

Zur direkten Titration der Festphase soll sich 0,1 M Perchlorsäure in Eisessig/Methylenchlorid eignen, und zwar sogar bei Restbeladungsbestimmungen. Dies scheint jedoch wegen allfälliger BOC-Gruppen-Abspaltung bedenklich ⁴³.

Die spektrophotometrische Ausmessung von Reaktionspartnern in der überstehenden Lösung (z.B. nach der Kupplung mit p-Nitrophenylestern oder bei der Verwendung von NPS-Schutzgruppen) ist eine andere Möglichkeit ⁴⁴.

5.3. Grundsätzliche Überlegungen zur Harzanalytik

Um die Zuverlässigkeit einer analytischen Methode zu überprüfen, müssen Eichproben (analytische Standards) zur Verfügung stehen. Bei üblichen chemischen Arbeiten in homogener Phase können chemisch reine und damit einwandfrei charakterisierte Substanzen als Urtiter und Titer verwendet werden. Bei der Festkörpersynthese jedoch gibt es wegen Mangel an Reproduzierbarkeit keine einwandfrei charakterisierten Produkte, somit auch keine Standards. Mit anderen Worten: die Synthese geeigneter Standards scheitert an der Zuverlässigkeit der Reaktionen. Aber selbst wenn definierte Eichproben verfügbar wären, so könnten

diese wegen mangelnder Vergleichbarkeit mit Analysenproben nicht unbedenklich verwendet werden. Der Beladungstyp und die Beladung der Eichproben müssen mit Beladungstyp und Beladung der Analysenprobe wenn nicht identisch, so doch möglichst ähnlich sein. Diese Forderung versteht sich aus der Erkenntnis, dass Harzeigenschaften, wie Ionenaustauschereigenschaften, unspezifische Adsorptionen, Mikroinhomogenität, Mikrobeweglichkeit, Permeabilität etc., wesentlich von der Art der Beladung abhängig sind. Es ist also so gut wie aussichtslos, für jedes Resinopeptid einen geeigneten Standard zu finden.

Nicht nur die Substrate, sondern auch die Analysenmethoden selbst müssen standardisiert werden. Die Blindwerte können bei Analysen innerhalb einer Syntheseriehe auf Grund ungleicher Adsorptionen oder beladungsabhängiger Harzeigenschaften ändern. Man muss z.B. vermuten, dass die Zersetzung von $\text{NEt}_3/\text{CHCl}_3$ bzw. $\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Lösungen, wie sie von manchen Autoren in der Säure-Basen-Analytik verwendet werden, je nach Festphase, die auf diese Lösungen einwirkt, verschieden weit geht. Dabei entstehen dann verschiedene Mengen Chlorid-Ion, und in der Folge davon findet man Analysenwerte, die von Fall zu Fall mit verschiedenen Fehlern behaftet sind. Die übliche Korrektur durch einen Blindwert ist unter solchen Umständen nicht mehr möglich (5.2.1.1.)

Die bekannten analytischen Methoden liefern zum Teil stark unterschiedliche Ergebnisse. Da man einem Ergebnis einer einzelnen Methode nicht ansieht, ob es richtig oder falsch ist, kann nur seine Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Methoden als Mass für seine Zuverlässigkeit gelten. Es ist also nur auf der Basis von Mittelwerten, die verschiedene methodische Provenienz besitzen, möglich, ein der Wirklichkeit entsprechendes Bild des Syntheseverlaufes

zu erhalten. Man muss also in der Festphasenanalytik mit Mittelwerten aus Mittelwerten aus Mittelwerten operieren und muss bei der letzten Mittelung, nämlich jener über die Methoden, die Ausreisser eliminieren.

5.4. Zusammenfassung

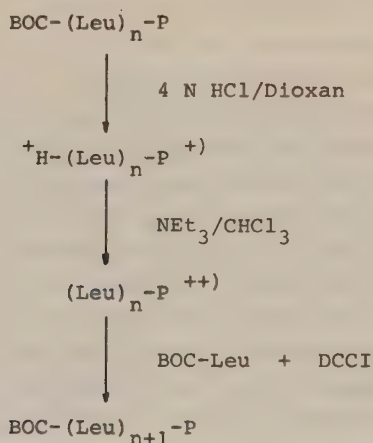
Analysenmethoden, die auf verschiedenen chemischen Reaktionen beruhen, liefern zum Teil erheblich voneinander verschiedene Ergebnisse, selbst wenn die Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Methoden gut ist. Weil geeignete Analysenstandards fehlen, kann nicht entschieden werden, welche Methode den wirklichen Wert der zu erfassenden Grösse am besten wiedergibt. Es ist zu bedenken, dass jede analytische Reaktion nur eine ganz bestimmte Eigenschaft einer zu bestimmenden funktionellen Gruppe erfasst. Die HCl-Elutionsmethode z.B. sagt nur etwas aus über die Anzahl basischer Gruppen, nicht aber über deren Konstitution. Auch die Acylierungsreaktionen erfassen eine acylierbare Anzahl Gruppen und damit u.a. Hydroxymethylgruppen, die wir eigentlich gar nicht bestimmen wollen.

Es ist daher unbedingt erforderlich, alle verfügbaren analytischen Reaktionen bei der Umsatzanalyse anzuwenden und die Ergebnisse vergleichend zu diskutieren. Wahrscheinlich wird es dennoch unmöglich bleiben, bei der Festphasensynthese exakte umsatzanalytische Aussagen zu erhalten.

6. Synthesen

6.1. BOC-Hexaleucyl-Polymer (BOC-(Leu)₆-P)

Durch 5-faches Wiederholen des nachfolgenden Synthesecyclus und anschliessender Ablösung vom Harz wurde das SP-Peptid (Leu)₆ hergestellt.



n = 1-5

+) Analyse: Totalbeladung

++) Analyse: Restbeladung

Nach den bisher für die Festphase allgemein üblichen Kriterien (Beladungsanalysen nach HCl-Elutionsmethode und Dorman-Methode) kann der Verlauf der Synthese über alle 5 Stufen als nahezu ideal bezeichnet werden: die ermittelten Totalbeladungen blieben über alle Syntheseschritte innerhalb 0,5 % konstant. Quantitative Schutzgruppen-Abspaltung ist somit garantiert. Ebenfalls quantitativ schienen die Kupp-

lungen zu verlaufen, denn die Restbeladungen - nach der Dorman-Methode bestimmt - waren auf keiner Stufe grösser als 0,5 % der Totalbeladung. Die Ninhydrin-Teste nach Kaiser waren stets negativ.

Die HCl-Elutionsmethode macht aber nur Aussagen über Konstanz oder Veränderungen der Anzahl der basischen Gruppen. Nun ist, wie wir wissen, ein Teil der Aminogruppen weder für Acylierungsmittel (also auch nicht für aktivierte Aminosäuren) noch für Hydroxynaphtaldehyd zugänglich. In der Tat zeigen Umsatzanalysen an Hand von Acylierungsreaktionen einen ganz anderen Syntheseverlauf.

So ist die Totalbeladung nach der Acetimidazol-Methode wesentlich kleiner als nach der HCl-Elutionsmethode. Sie nimmt zudem während des Syntheseverlaufes deutlich ab. Es kann nicht entschieden werden, ob diese Abnahme der Beladung auf einer realen Abnahme der Aminogruppen, auf einer Abnahme von acylierbaren Gruppen oder aber auf zunehmender Unzugänglichkeit dieser Gruppen beruht. Aus den verschiedenen Analysenergebnissen lässt sich daher nur ein grobes Bild der Synthese machen (vgl. graphische Darstellung S. 36). Dieses besagt, dass die Synthese im wesentlichen wie erwartet unvollkommen verlaufen ist.

6.2. Oligoleucyl-Polymere ((Leu)_n-P, n = 2-6)

Trotz der schlechten Erfahrungen nach 6.1. wurde die Synthese unter denselben Reaktionsbedingungen präparativ bis zum entschützten Hexaleucyl-Polymer durchgezogen. Auf analytische Verfolgung der Synthesen wurde verzichtet. Diese Produkte boten sich als willkommenes Ausgangsmaterial zur Bearbeitung der eigentlichen Problemstellung an. Ihre Mängel waren in diesem Zusammenhang irrelevant.

6.3. Oligoleucine ((Leu)_n, n = 2-6)

Das Peptidmaterial wurde aus den entsprechenden Resino-BOC-Peptiden BOC-(Leu)_n-P durch Reaktion mit HBr-Gas in Trifluoressigsäure vom Harz abgelöst. Die Ausbeuten an Rohprodukt lagen durchweg in der Grössenordnung von 100 %. Die Ablösungen erfolgten also praktisch quantitativ. Ein Befund, den die Reststickstoff-Analysen am abgespaltenen Harz bestätigen.

Bei der Verwendung von 5,5 N Ammoniak in Methanol als Abspaltreagenz betrugen die Ausbeuten nur wenige Prozent der theoretisch zu erwartenden Mengen an Peptid ⁴⁶.

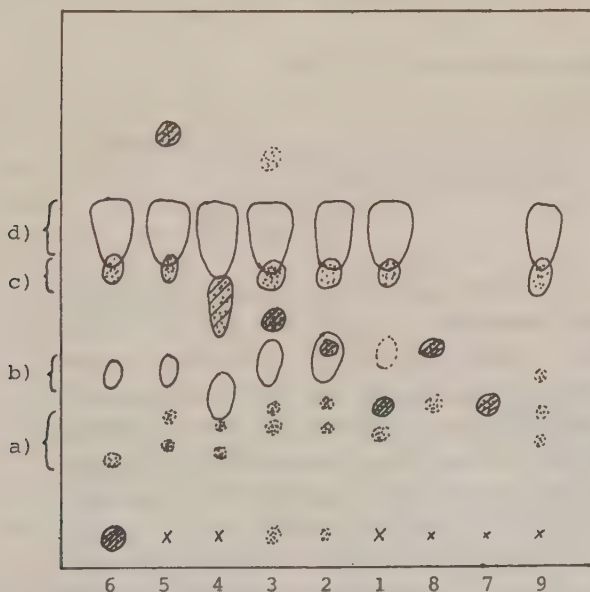
Wegen der äusserst schlechten Löslichkeit in den meisten gängigen Lösungsmitteln musste Abderhalden ⁴⁷ sein Vorhaben höhere Oligoleucine zu synthetisieren, bereits beim Pentapeptid aufgeben. In folgenden Lösungsmitteln ist keinerlei Löslichkeit von (Leu)₆ zu beobachten: AcOH/H₂O (3:1/v:v); MeOH/H₂O (1:1/v:v); Essigester; EtOH (abs.); Acetonitril; Methylcellosolve; Ameisensäuremethylester. Ein geringer Anteil der Substanz löst sich in Dioxan/2 N HCl; DMF; N,N-Dimethylacetamid/Ameisensäure. Als gutes Lösungsmittel erweist sich N,N-Dimethylacetamid, als vorzügliches Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT). Ein wesentlicher Nachteil dieses Lösungsmittels ist allerdings seine geringe Flüchtigkeit, so dass es selbst bei erhöhter Temperatur und Hochvakuum beispielsweise nur sehr schwer von DC-Platten entfernt werden kann. Für die folgenden DC-Versuche werden die Rohprodukte in HMPT gelöst.

Nach jedem Syntheseschritt wurden Proben des jeweiligen Oligoleucyl-Polymeren abgespalten, die Reaktionsmischung eingedampft, der Rückstand in HMPT aufgenommen und direkt auf Kieselgel in sec. BuOH/ 1 % Ammoniak wässr. (100:44/v:v) chromatographiert. Die R_f-Werte der Oligoleucine

(schraffierte Flächen) nehmen mit steigendem Molekulargewicht zu. Hexaleucin bleibt am Start sitzen, da es im Chromatographiersystem unlöslich ist. Die Fleckenserien a), c) und d) stammen aus dem HMPT, wie ein Vergleichs-chromatogramm zeigt. Die Tolidin-positiven, Ninhydrin-negativen, relativ starken Flecken der Serie b) sind ungeklärt. Sie sind nicht mit Flecken von Dicyclohexylharnstoff, DCCI oder BOC-Leucin identisch.

Oligoleucine aus Synthese 6.1.

Fliessmittel: sec. BuOH/1 % NH₃ (wässr.) (100:44/v:v)
(Auftragemenge und Entwicklung des Chromatogrammes siehe exp. Teil 9.)



● Ninhydrin-positiv, ○ Tolidin-positiv, Ninhydrin-negativ

1-6: rohe Abspaltprodukte der Synthesestufen 1-6 (6.1.)

7: Leucin (Referenzprobe)

8: Dileucin (Referenzprobe)

9: Hexamethylphosphorsäuretriamid

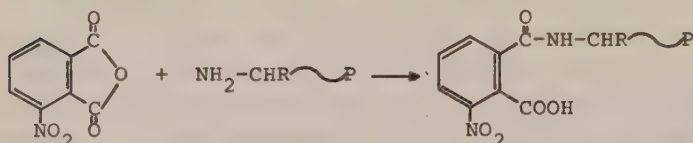
○ sehr schwache Flecken

Aus dem Dünnschichtchromatogramm ist klar ersichtlich, dass keine $(\text{Leu})_n$ -Probe mit wesentlichen Anteilen einer einheitlichen Substanz $(\text{Leu})_{n-y}$, $y = 1, 2 \dots (n-1)$ verunreinigt ist. Andererseits ist aber nicht auszuschliessen - oder sogar wahrscheinlich (analytische Daten!) - dass alle $(\text{Leu})_{n-y}$ neben $(\text{Leu})_n$ vorhanden sind, aber in Mengen, die im DC nicht mehr erfasst wurden.

6.4. Acyl-(Leucyl) $_n$ -Polymere ($n = 1-6$)

Bei der Diskussion um den Nachweis von BA/AAE ist als Verfahren eine Simulierkupplungsprozedur erwogen worden (4.5.). Zur Einführung irreversibler Aminoschutzgruppen kamen in Betracht:

1) 3-Nitrophthalsäureanhydrid (NPA)

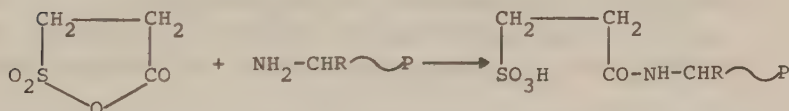


Birr et al. ³⁷ blockieren nicht umgesetzte Amino-
gruppen nach jedem Kupplungsschritt mit 3-Nitrophthal-
säureanhydrid. Somit wird ein Weiterkuppeln dieser
Rumpfpptide auf einer späteren Synthesestufe unter-
bunden. ⁺ 3-Nitrophthalamidsäuren sind stark sauer
($pK = 2,3$). Sie lassen sich leicht mit Hilfe eines
Anionenaustauschers aus dem abgespaltenen Gemisch
abtrennen.

⁺ Birr erwähnt nicht, was die freien Carboxyl-Gruppen,
die er mit seinem Verfahren in das Resinopeptid ein-
führt, im Verlaufe der weiteren Umsetzungen tun.

Birr verwendet - bezogen auf die Totalbeladung - etwa 1,1 Äquivalente Acylierungsreagenz. Bei Annahme, dass ca. 10 % des Peptidmaterials nicht gekuppelt haben, also ungeschützt vorliegen, wäre dies ein 11-facher Überschuss an 3-Nitrophthalsäureanhydrid. In eigenen Versuchen war nach Umsatz von Hexaleucyl-Polymer mit einem 2-fachen Überschuss an NPA der Ninhydrin-Test noch stark positiv. Ein 5-facher Überschuss an Acylierungskomponente brachte die Ninhydrin-positiven Aminogruppen nahezu zum Verschwinden.

2) 3-Sulfopropionsäureanhydrid



3-Sulfopropionsäureanhydrid ³⁸ scheint selbst bei 40-fachem Überschuss in bis zu 16 -stündiger Reaktionszeit ungenügende Acylierungswirkung zu besitzen. Ausserdem ist die Substanz experimentell schwierig zu handhaben, da sie stark hygroskopisch ist.

3) Acetimidazol



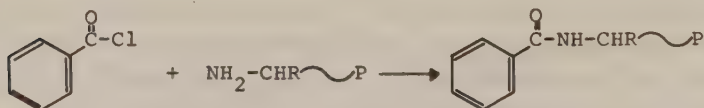
Nach Dorman ³¹ blockiert Acetylimidazol freie Aminogruppen in 10-fachem Überschuss sehr erfolgreich. Wir versuchten zunächst, Oligoleucyl-Polymere (n = 2-6) mit einem 3-fachen Überschuss an Acetylimidazol in Methylenchlorid umzusetzen. Im Ninhydrin-Test blieben die Di- bis Tetra-

Resinopeptide schwach positiv, im Gegensatz zu den beiden höheren Homologen. Alle Produkte wurden hierauf nochmals mit einem 10-fachen Überschuss an Acetylimidazol nachacyliert, und alle waren nunmehr Ninhydrin-negativ.

Mit der Acetylschutzgruppe wird eine den Peptidbindungen immerhin sehr ähnliche Amidbindung eingeführt. Diese Tatsache ist im Zusammenhang mit dem BA/AAE-Nachweis insofern wichtig, als eine Einlagerung in diese Acetamid-Bindung auch als repräsentativ für die Einlagerung in eine Peptidbindung angesehen werden darf.

Andere Acetylierungsgemische wie $\text{Ac}_2\text{O}/\text{NEt}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1:1/v:v:v) und $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1:10/v:v:v) blockierten nicht zufriedenstellend.

4) Benzoylchlorid



Der Umsatz mit Benzoylchlorid erweist sich ebenfalls als sehr effektiv. Der Ninhydrin-Test lässt zwar nach der Reaktion von Hexaleucyl-Polymer mit $\text{BzCl}/\text{Py}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1:10/v:v:v) noch auf das Vorhandensein freier Aminogruppen schliessen. Auch die Beladungsanalysen nach der HCl -Elutionsmethode erbrachte 20 %, nach der Dorman-Methode 13 % freies Amin. Die Acylierung mit $\text{BzCl}/\text{Py}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1:4/v:v:v) führte bereits zu besseren Ergebnissen: die Ninhydrin-positiven Aminogruppen verschwanden in der Regel.

Einfluss von n auf die präparative Benzoylierbarkeit von $(\text{Leu})_n$ -Polymeren ist nicht festgestellt worden (Ninhydrin-Test). Weiter untersucht worden ist von allen diesen Produkten nur das $\text{Bz}-(\text{Leu})_6$ -Polymer. Und auch diese Untersuchung verfolgte im wesentlichen nur den Zweck, die notwendige Erfahrung für die spätere Behandlung des Einlagerungsproblems zu liefern.

6.5. Das SP-Peptid Benzoylhexaleucin

Die Behandlung von 7 g trockenem $\text{Bz}-(\text{Leu})_6$ -Polymer mit HBr/TFA unter den üblichen Bedingungen, Abfiltrieren des Spaltharzes und Eindampfen des Filtrates lieferte 2,5 g eines amorphen SP-Benzoylhexaleucins.

Nachdem die harzanalytischen Daten vermuten liessen, dass unser SP-Benzoylhexaleucin uneinheitlich sei, war es gegeben, die Einheitlichkeitsfrage auch am Produkt selber zu überprüfen. Im folgenden werden die Versuche beschrieben, welche in dieser Richtung unternommen worden sind.

6.5.1. Fraktionierung

Beim Auflösen des Rohproduktes in $\text{TFE/MeOH}^+(1:6/\text{v:v})$ ging der grösste Teil der amorphen Substanz sofort in Lösung. Es wurde sofort abfiltriert, und nach kurzer Zeit schied sich eine kristallisierte Fraktion ab; Kristallisat und Mutterlauge wurden durch Filtration getrennt.

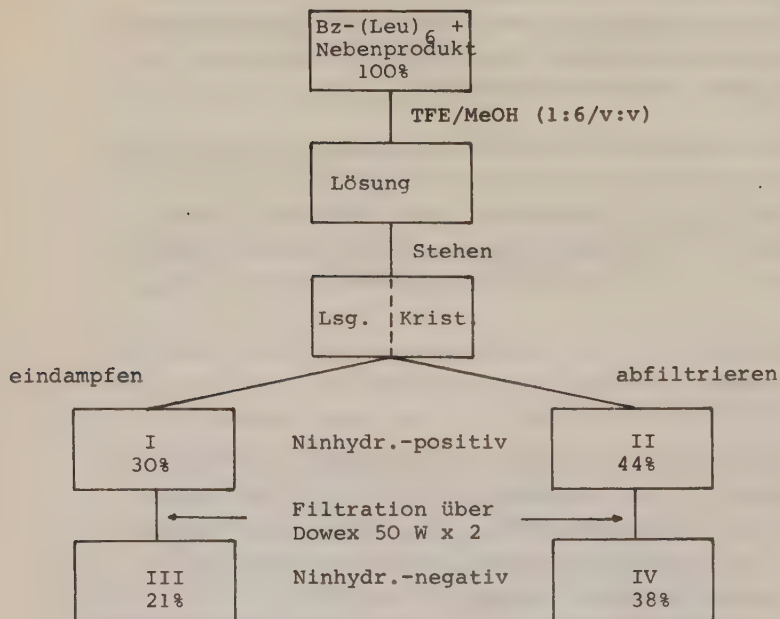
Zur Entfernung von beigemengtem Ninhydrin-positiven Material aus Kristallisat und Mutterlauge erwies sich eine Fil-

⁺ $\text{TFE} = \text{Trifluoräthanol}$

tration über den stark sauren Ionenaustauscher Dowex 50 W x 2 (H-Form) in MeOH/TFE (6:1/v:v) als sehr erfolgreich. Aus den Eluaten kristallisieren nach dem Einengen die Fraktionen III (aus I) und IV (aus II): nachfolgendes Schema.

Die Effizienz dieser Trennmethode hat sich auch später bestätigt (8.)

Fraktionierung von Benzoylhexaleucin



6.5.2. Spektroskopische Daten und Elementaranalysen

Die Infrarot-Spektren der Fraktionen III und IV sind vollkommen identisch: Amidbanden bei 1630 cm^{-1} resp. 1530 cm^{-1} , die Carbonylbanden von I und II bei 1710 cm^{-1} , von III und IV bei 1740 cm^{-1} .

Die einzige mögliche Veränderung an der Carbonyl-Funktion kann nur eine Veresterung während der Trennung sein. Das Sulfosäureharz ist hierfür ein guter Katalysator. Tatsächlich geben III und IV qualitativ nach Zeisel Methyljodid. Potentiometrischen Titrationen zufolge liegen 20 % von IV als freie Säure vor. Ein Ester/Säure-Verhältnis von 4:1 scheint auch laut DC-Untersuchungen von IV vorzuliegen (exp. Teil 9.2.).

Die Existenz von Phenyl-Resten kann im UV-Spektrum von IV durch die Banden bei $225,5\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 12800$) und bei $266\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 1034$) verifiziert werden.

Elementaranalyse: Die Ergebnisse der Kohlenstoff-Wasserstoffbestimmungen entsprechen innerhalb der zulässigen Fehlergrenzen den Daten für Benzoylhexaleucylmethylester.

Die Fraktion IV könnte, wenn man diese Daten betrachtet, ein Gemisch von reinem Benzoylhexaleucin und Benzoylhexaleucylmethylester sein. Bewiesen ist dieser Sachverhalt allerdings nicht. Denn weder IR-Spektroskopie noch die Elementaranalyse wären imstande, die Anwesenheit von Verunreinigungen ähnlicher Zusammensetzungen aufzudecken.

6.5.3. Löslichkeiten

Fraktion IV, vermutlich im wesentlichen ein Gemisch aus Ben-

zöylhexaleucin und dessen Methylester ist im Vergleich zum freien SP-Hexaleucin wesentlich besser löslich. Trifluor-äthanol ist ein geradezu ideales Lösungsmittel. Für sämtliche Experimente wurde - aus kommerziellen Gründen - ein Lösungsmittelgemisch aus TFE/MeOH (1:6/v:v) verwendet. Die Löslichkeit hierin ist zwar im Vergleich zum reinen TFE deutlich geringer, jedoch immer noch recht gut. Ebenfalls sehr gut eignet sich Trifluoressigsäure als Lösungsmittel, während der Methylester überhaupt keine Lösungseigenschaften zeigt. Andere fluoridierte Lösungsmittel, so z.B. 1 H, 1 H, 3 H Tetrafluor-1-propanol könnten eventuell auch Verwendung finden. Hexafluoraceton oder wässrige Lithiumchloridlösung sind nicht zu gebrauchen.

6.5.4. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

DC-Untersuchungen auf Kieselgel zeigen, dass IV im Gegensatz zum SP-Hexaleucin chromatographierbar ist - zweifelsohne wegen besserer Löslichkeit.

Die Fraktion I ist uneinheitlich. Sie enthält insbesondere Tolidin- und Ninhydrin-positives Material. Nach der Ionenaustauscher-Filtration ist letzteres verschwunden; es bleiben in III 2 Flecken wie in IV (R_f : 0,55 - 0,63; 0,74 - 0,84). Beide Flecken sind nur noch durch Fluoreszenzlöschung nachweisbar.

Fraktion II erscheint einheitlich (UV-aktiver Fleck, R_f : 0,55 - 0,63). Der positive Ninhydrintest in Lösung zeigt jedoch an, dass noch ungeschütztes Peptidmaterial vorhanden ist.

Fraktion IV, die bereits oben als vermutliches Gemisch von Benzöylhexaleucin und Benzöylhexaleucinmethylester angesprochen worden ist, gibt wie die ebenfalls ionenaustauscher-

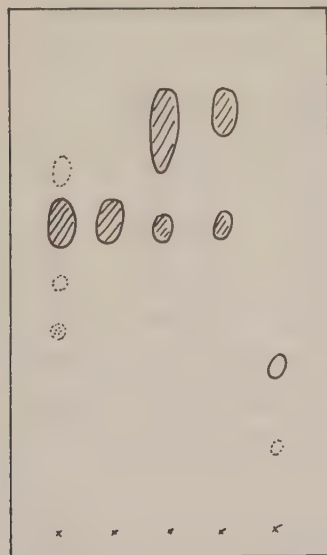
behandelte Fraktion III in der Tat einen UV-aktiven Doppelfleck. Einer davon ist mit dem Fleck aus Fraktion II identisch und somit offenbar dem Benzoylhexaleucin zuzuordnen. Der andere - mit dem grösseren Rf-Wert - repräsentiert also den Methylester. Auch das Intensitätsverhältnis der Flecken entspricht den titrimetrischen Ergebnissen, wonach das Verhältnis Säure/Ester 1/4 ist.

Die Bz-(Leu)₆-Fraktionen I - IV (vgl. 6.5.1.)

Fliessmittel: sec. BuOH/1 % NH₃ (wässr.) (100:44/v:v)

Auftragemenge: 40 µ

(Entwicklung des Chromatogrammes siehe exp. Teil 9.)



- ⊗ Ninhydr.-positiv
- Tolidin-positiv, Ninhydr.-negativ
- ⊗ UV-aktiv
- ⊙ sehr schwache Flecken

I II III IV Z-(Leu)₃-OH

6.5.5. Säulenchromatographische Untersuchungen

Zu säulenchromatographischen Untersuchungen der beiden SP-Benzoylhexaleucin-Fraktionen III und IV kommen wegen der Löslichkeitseigenschaften nur nichtwässrige Systeme in Betracht. Systeme, wie z.B. Sephadex G-10/DMF, LH-20/DMF/MeOH (1:1/v:v), Anionenaustauscher IRA-410/2 % NH_4Ac in TFE/MeOH, IRA-410/ NH_4Ac -gradient in TFE/MeOH, Kieselgel/MeOH/ CHCl_3 führten wegen schlechter Trennung zu keinen positiven Ergebnissen. Vermutlich enthält die Matrix der obigen Adsorbentien noch Wasser, das bei der Umquellung mit organischen Lösungsmitteln nicht entfernt werden kann.

Trennung in TFE/MeOH auf Sephadex LH-20

Ein ungefähres Bild der Trennkapazität dieses Systems ergibt sich aus der folgenden Übersichtstabelle.

Gelchromatographie verschiedener Leucin-Derivate an LH-20

Substanz:	mittl. Retentionsvolumen (ml):	mittlere Abweichung (%):	Anzahl Versuche:
Bz-Leu-OH	66,6	2,9	6
Bz-Leu-OMe	59	3,7	3
Bz-(Leu) ₂ -OH	54	4,3	4
Bz-(Leu) ₆ -OMe	42,6	6,5	9
Bz-(Leu) ₆ -OH			
Bz-OH	81	4,5	5

Säulendimension: 150 cm x 0,9 cm

Temperatur: 37°C

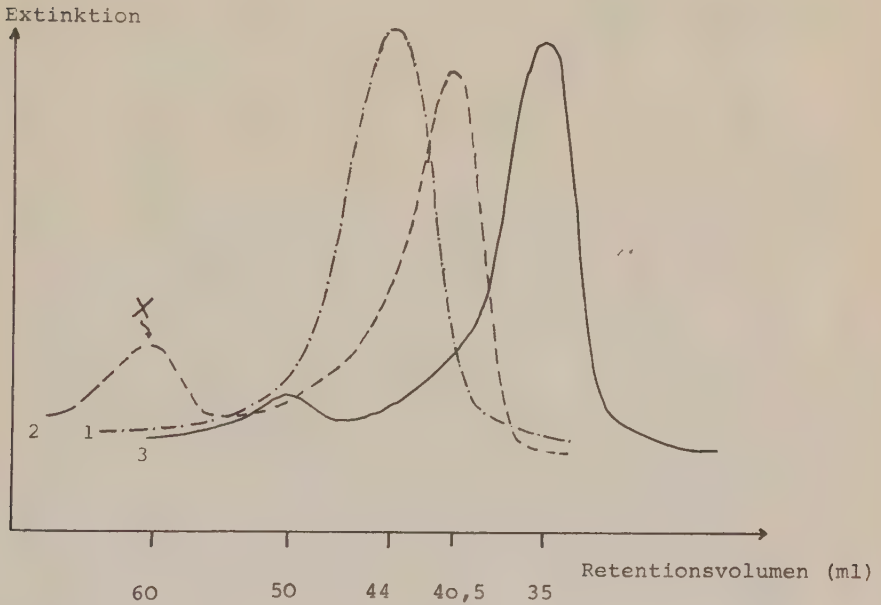
Detektor: Uvicord

Säulenchromatogramm 1 - 3

Adsorbens: LH 20

Elutionsmittel: TFE/MeOH (1:6)

Durchlaufgeschw.: ca. 60 ml/h



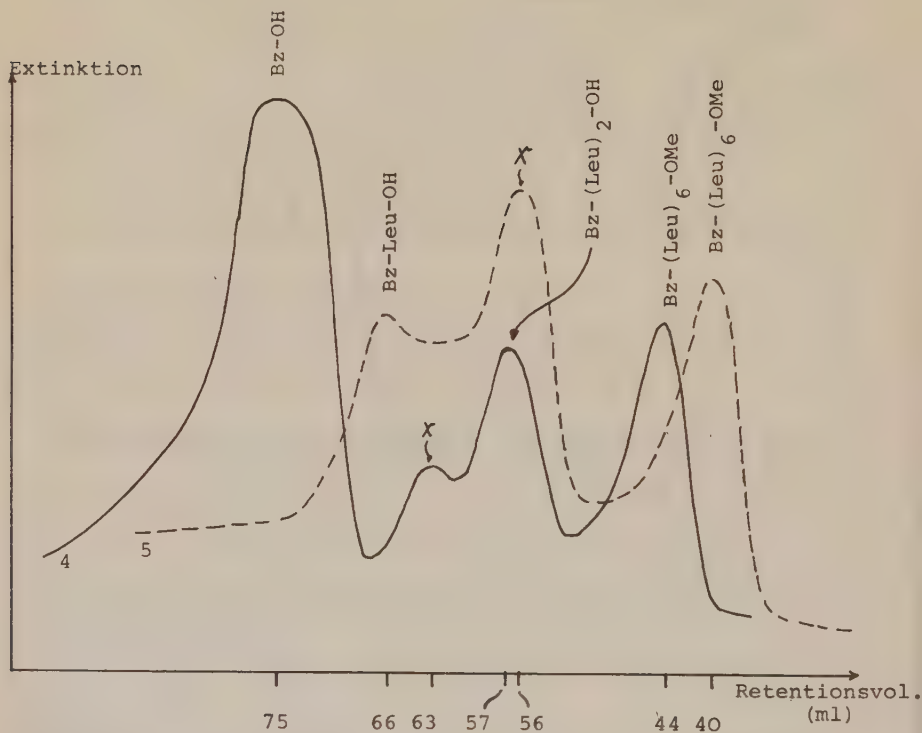
Chromatogramm 1 : Kristallisat (IV), Säule nicht thermostatisiert

Chromatogramm 2 : Mutterlauge (III), Säule auf 34,5°C thermost.

Chromatogramm 3 : Kristallisat (IV) und Mutterlauge (III),
Säule nicht thermostatisiert

Säulenchromatogramm 4 und 5

(Bedingungen siehe Chromatogramm 1-3)



Chromatogramm 4 : Bz-OH, Bz-(Leu)₂-OH, Mutterlauge (III)

Chromatogramm 5 : Bz-Leu-OH, Bz-Leu-OMe, Mutterlauge (III)
Peak X erhöht sich mit zunehmender Konzen-
tration an Bz-Leu-OMe

Die relative Grösse der verschiedenen Retentionsvolumina spricht für einen Molekularsiebeffekt. Die Volumenintervalle zwischen den Peaks sind leider nicht gross genug, um mit Sicherheit Mischungen von benachbarten Homologen der Bz-(Leu)_n-Reihe erkennbar zu machen.

Da es hier aber wiederum um Gewinn von Erfahrungen ging, sind die Fraktionen III und IV gleichwohl einer Trennungsoption im obigen System unterworfen worden:

Fraktion IV ergab einen einzigen, relativ schlanken und symmetrischen Peak, obschon die Substanz aus mindestens 2 Komponenten im Verhältnis 4:1 besteht (Chromatogramm 1). Fraktion III lieferte 2 Peaks (Chromatogramm 2). Der grössere mit kleinerem Retentionsvolumen repräsentiert Benzoylhexaleucylmethylester und Benzoylhexaleucin, aber in offensichtlich weniger reiner Form als in Chromatogramm 1. Der langgezogene Peakschwanz verrät die Gegenwart von kleineren Homologen (Mischchromatogramm 3)! Peak X in Chromatogramm 2 ist wieder symmetrisch und aufgrund seines Retentionsvolumens (60 ml) einer Beimengung von Benzoylleucylmethylester zuzuschreiben. Diese Zuordnung wird durch das Mischchromatogramm 5 bestätigt, in dem hier die Peakhöhe entsprechend der Zugabe von Benzoylleucylmethylester ansteigt. Die Abgrenzung gegenüber Benzoesäure und Benzoyldileucin ist eindeutig (Chromatogramm 4). Endgültige Sicherheit über die Identität von X mit Benzoylleucylmethylester wurde gaschromatographisch erbracht.

Trennung in MeOH auf Sephadex LH 20

Hier gelingt die Auftrennung der Fraktion III in Benzoylhexaleucylmethylester und Benzoylhexaleucin! Von den Eluatfraktionen 1 und 2 konnten IR-Spektren aufgenommen werden. Fraktion 1 enthält typische Peptidbanden (1628 cm^{-1} , 1535 cm^{-1}) und eine Carbonylbande bei 1720 cm^{-1} .

Es dürfte sich hier wohl um Benzoylhexaleucin als freie Säure handeln. Demgegenüber ist die Carbonylbande der Fraktion 2 nach 1740 cm^{-1} verschoben. Dieses Spektrum ist vollkommen identisch mit dem Spektrum von Benzoylhexaleucinmethylester (Fraktionen III und IV, vgl. 6.5.2.). Das Verhältnis der Peakfläche 2 zur Peakfläche 1, d.h. Ester zu Säure, stimmt mit den bisherigen Ergebnissen überein.

Säulenchromatogramm 6

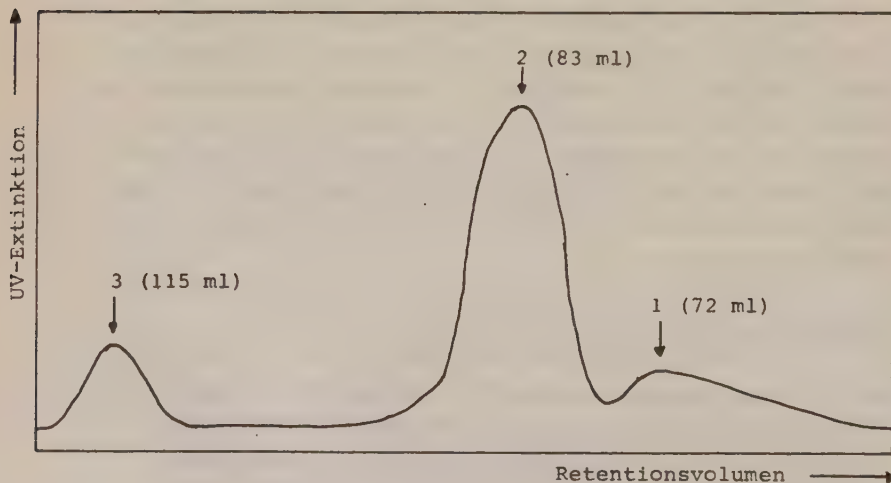
Substrat: Fraktion III nach Schema auf S. 50

Adsorbens: LH 20

Elutionsmittel: MeOH

Säulendimension: 150 cm x 0,9 cm

Temperatur: 37°C



6.5.6. Die Herkunft von Benzoylleucylmethylester

Einem Vergleich der Peakflächen in Chromatogramm 2 und 6 entnimmt man, dass Fraktion III etwa 20 Molprozent an Benzoylleucinmethylester enthält.

Im SP-Hexaleucin, genauer gesagt im Ionenaustauschereluat finden wir also auf 11 Mole Benzoylhexaleucin ungefähr 1 Mol Benzoylleucinmethylester. Über seine Herkunft kann man nur spekulieren. Die Beobachtung könnte z.B. bedeuten, dass wenigstens jede 12. Startaminosäure im Verlauf der Synthese keinen Reaktionspartner fand.

Eine andere Erklärung ginge dahin, dass während der Benzoylierung des Resinohexaleucins auch Backbone-Benzoylierung auftrat, und dass diese unter den Bedingungen der Festphasensynthese ein kooperativer Prozess ist. Ein Molekül perbenzoyliertes Hexaleucin kann unter den Bedingungen der Peptidablösung vom Harz ohne weiteres 6 Moleküle Benzoylleucin liefern. Wird also von 67 Resino-Benzoylhexaleucin-Ketten auch nur eine perbenzoyliert, so resultieren nach der Abspaltung 66 Moleküle Benzoylhexaleucin und 6 Moleküle Benzoylleucin, entsprechend einem Mol-Verhältnis 11:1.

7. Simuliercyclen mit BOC-Phe bzw. NPS-Phe

Definition eines Simuliercyclus und die Begründung für seine Durchführung findet sich auf Seite 23 ff.

7.1. Simuliercyclen an Benzoylhexaleucyl-Polymer

Es wurden 5 Simuliercyclen durchgeführt.

Durch Spaltung eines Benzoyl-Resinopeptides infolge von Backbone-Acylierung werden Aminogruppen freigesetzt (vgl. 2.). Backbone-Acylierung und nachfolgende Peptidspaltung müssen also in einer Zunahme der "Totalbelastung" ⁺ ihren Ausdruck finden.

Wir bestimmten daher nach jeder Simulierkupplung die Restbelastung und nach jeder simulierten Schutzgruppenabspaltung die "Totalbelastung". Die gefundenen Totalbelastungswerte sind tatsächlich um einige Prozent höher als der Totalbelastungswert des anfangs eingesetzten Benzoyl-Resinopeptides. Diese Tatsache ist ein weiteres (vgl. 1.2.4.) Indiz für die Existenz der Backbone-Acylierung.

Würde die Peptidspaltung während des Deblockierungsschrittes auftreten, so müsste die Verwendung von labileren Schutzgruppen und infolgedessen milderer Deblockierungsbedingungen zu einer Erhöhung der Einlagerungsrate durch Begünstigung der mit der Spaltungsreaktion konkurrierenden Einlagerungsreaktion führen.

Aus diesem Grunde führten wir 5 Simuliercyclen mit dem o-Nitrophenylsulphenyl-Derivat des Phenylalanins an Benzoylhexa-

⁺ Wir setzen die Totalbelastung in Anführungszeichen, weil der theoretische Wert der Totalbelastung im Falle eines Resino-Irr-Peptides bei Null liegt.

leucyl-Polymer durch (die NPS-Schutzgruppe kann im Vergleich zur BOC-Schutzgruppe unter wesentlich schonenderen Bedingungen abgespalten werden, vgl. 1.1.3.2.). Auch hier bestimmte man die Total- und Restbeladung über Säure/Base-Austausch. Die Ergebnisse liegen hier nicht so eindeutig wie im Falle der Simulierkupplung mit BOC-Phe: anstatt der erwartenden Zunahme an freien Aminogruppen fand man "Totalbeladungswerte", die sogar erheblich unter dem Totalbeladungswert des ursprünglich eingesetzten Benzoylhexaleucyl-Polymers liegen. Eine Erklärung für diese Tatsache kann nicht gegeben werden (vgl. exp. Teil 4.4.).

7.2. Simuliercyclen an Acyl-(Leucyl)_n-Polymeren, n = 1, 2 ... 6

An acetylierten resp. benzylierten (Leucyl)_n-Polymeren der Reihe n = 1, 2 ... 6 wurden mit BOC-Phe je 5 Simuliercyclen durchgeführt. Auf analytische Verfolgung der Simulierkupplungen wurde verzichtet.

8. Filtration der nachbehandelten ⁺ Acylpeptide über Sulfosäureharz

Die nachbehandelten Acylpeptide wurden nach ihrer Ablösung vom Harz zwecks Abtrennung des ungeschützten Peptidmaterials über das Sulfosäureharz Dowex 50 W x 2 filtriert. Als Lösungsmittel eignete sich hierfür TFE/MeOH (1:6/v:v). Bei negativem Ninhydrin-Test des Filtrates wurde die Abtrennung freier Peptide als erfolgreich betrachtet.

Die Zuverlässigkeit dieser Trennmethode wurde getestet, indem man ein synthetisches Gemisch (Merrifield-Rohprodukte) von Benzoylhexaleucylmethylester und Phenylalanylhexaleucin in gleichen Gewichtsmengen den Trennbedingungen aussetzte. Nach Eindampfen des Eluates wurde das Peptidmaterial in 6 N HCl/TFE (1:1/v:v) hydrolysiert. Im Hydrolysat war nach der üblichen Nachweismethode nicht die geringste Spur an Phenylalanin nachweisbar. Folglich wurde bei der Trennoperation das ungeschützte Heptapeptid quantitativ zurückgehalten. Dieses Ergebnis beweist die Effizienz dieses Trennverfahrens.

Das zur Test-Trennung eingesetzte Verhältnis von freiem zu geschütztem Peptid dürfte dem Verhältnis freiem zu geschütztem Peptid im nachbehandelten Peptidmaterial entsprechen. Infolgedessen dürfen wir also auch bei der Filtration der nachbehandelten Peptide mit einer quantitativen Abtrennung ungeschützter Produkte rechnen.

Laut Chlorid-Titration beträgt der Anteil an freiem Peptid im nicht nachbehandelten Benzoylhexaleucyl-Polymer zwischen 13 und 20 %. Bei der Filtration wird aber bis zu 75 % der eingesetzten Menge auf der Ionenaustauschersäule zurückgehalten. Ein derart hoher Verlust an geschütztem Peptid kann nur durch Peptidspaltung infolge Backbone-Acylierung erklärt werden.

⁺ Nachbehandelt heisst: Simuliercyclen unterworfen.

9. Hydrolysen

Üblicherweise werden Peptide in 6 N wässriger HCl (110°C, 24 h resp. 72 h) hydrolysiert^{39,40,41}. Selbst wenn SP-Benzoylhexaleucin während 6 Tagen diesen Reaktionsbedingungen unterworfen wurde, konnten so gut wie keine Hydrolysenprodukte nachgewiesen werden, eine Tatsache, die auf die Unlöslichkeit des Substrates in 6 N HCl zurückzuführen ist.

Es galt daher, salzsaure Systeme mit guten Löslicheitseigenschaften für SP-Benzoylhexaleucin zu finden. In folgenden Systemen wurden Hydrolysen vorgenommen:

1. TFA/HCl konz. (1:1/v:v)
2. TFE/HCl konz. (1:1/v:v)
3. Phenol/6 N HCl (1:10/v:v)
4. Guanidin·HCl/6 N HCl (1:1/g:g)

SP-Benzoylhexaleucin liess sich in den Systemen 1 - 3 in zufriedenstellender Menge lösen. Der in System 4 anfangs ungelöste Anteil verschwand im Laufe der Hydrolyse.

In folgenden Mischungen konnte das Resino-Benzoylhexaleucin direkt hydrolysiert werden.

5. Dioxan/HCl konz. (1:1/v:v)
6. Phenol/6 N HCl (1:100/g:g)
7. Propionsäure/6 N HCl (1:20/v:v)

Laut DC verliefen sowohl die Hydrolysen der Peptide wie auch die Hydrolysen der Resinopeptide im wesentlichen erfolgreich. Ausser bei 3. ist in keinem Hydrolysat Benzoylhexaleucin dünnschichtchromatographisch auffindbar. 2. und 5. enthalten Spuren von Oligoleucinen. In 2. verschwanden diese jedoch nach 5 -tägigem Stehen bei Zimmertemperatur.

Ausser dem System 5 sind im Prinzip alle Systeme brauchbar. Wir haben uns wegen der hervorragenden Löslichkeit des Substrates in TFE/HCl konz. (1:1/v:v) für dieses entschieden.

10. Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen erfolgten im Prinzip nach der von Stein und Moore^{39,40,41} beschriebenen Methode. Danach wird das Aminosäuren-Gemisch zunächst auf einer Ionenaustauschersäule aufgetrennt. Die Menge des durch anschliessende Reaktion mit Ninhydrin gebildeten Farbstoffes ist ein Mass für die Menge der betreffenden Aminosäure. Diese Menge kann colorimetrisch ermittelt werden. Üblicherweise gibt man zur Analyse 0,5-2 μMol Aminosäure auf.

1 Molprozent Einlagerungspeptid liefert im Hydrolysat ein Molverhältnis Phe/Leu von 1 : 600. Die beiden Aminosäuren können infolge ihres zu grossen Konzentrationsunterschiedes nicht nebeneinander quantitativ nachgewiesen werden. Vielmehr erfordert der quantitative Nachweis von Phenylalanin neben grossen Überschüssen an Leucin eine Abweichung von der üblichen Analysenprozedur. (exp. Teil 1.2.2.).

Bekanntlich ist eine zeitliche Konstanz der Farbwerte von Ninhydrin-Lösungen nur sehr schwer zu erreichen. Peinliche Sauberkeit bei der Herstellung der Lösung (definierte Reinigung aller Gefässe vor Beginn der Arbeit !) vorausgesetzt, liegen oft keine ersichtlichen Gründe für die Instabilität der Ninhydrin-Lösung vor. So erhält man hie und da bereits schon bei der Herstellung der Lösung - insbesondere bei der Verwendung von SnCl_2 als Reduktionsmittel - trübe, nicht zu gebrauchende Lösungen.

Je nach der Herstellungsmethode der Ninhydrin-Lösung unterschieden sich die Farbwerte bis zu 60 % voneinander. Reduziert man mit SnCl_2 , so sind die Farbwerte innerhalb 15 % reproduzierbar.

Wesentlich bessere Erfahrungen machten wir bei der Reduktion des Ninhydrins mit TiCl_3 . Das Herstellen einer klaren Lösung bereitete kaum Schwierigkeiten. Die Reproduzierbarkeit der Farbwerte innerhalb eines Ansatzes lag immerhin bei 3 %; sie blieb über wenigstens 2 Tage innerhalb dieser Grenze konstant.

Um all diese Schwierigkeiten zu umgehen, trug man nach dem Aufgeben der Analysenprobe auf die Säule eine bekannte Menge Phenylalanin als Standard auf.

11. Ergebnisse und Diskussion

In den Hydrolysaten sämtlicher Acyl-(Leu)_n-Peptide (n = 1, 2 .. 6), welche ursprünglich - am Harz fixiert - mehreren Simuliercyclen mit BOC-Phe bzw. NPS-Phe unterworfen worden sind, kann Phenylalanin in wider Erwarten hohen Mengen nachgewiesen werden. Die Beweisführung wurde von Anfang an so angelegt (4.5.), dass die im Hydrolysat gefundene Menge an Phenylalanin ein direktes Mass für das Auftreten von Einlagerungspeptiden und folglich auch von Backbone-Acylierung ist. 1 Prozent Phenylalanin im Hydrolysat bedeutet: jede hundertste Resinopeptidkette lagert infolge Backbone-Acylierung einen Phenylalanyl-Rest ein und wird somit zum Fehlpeptid. Das Ausmass der Backbone-Acylierung ist aus Tabelle 1 und 2 ersichtlich. Es nimmt mit zunehmender Anzahl und zunehmender Reaktionsdauer der Simulierkupplungen zu.

Tabelle 1

BA/AAE-Versuche an Benzoylhexaleucyl-Polymer mit BOC-Phe

Anzahl Simuliercyclen:	Kupplungsdauer (h):	Mol-% Phe (Molare BA-Rate): ⁺	Abspalt-ausbeute (%): ⁺⁺	Bz-Peptid (%): ⁺⁺⁺
0	0	0	90	80
1	15	Spur	107	55
1	5 Tage	1,0	101	50
5	15	2,5	113	25
5	15	0,8	113	65 ¹⁾
5	15	1,2	87	78 ²⁾

- 1) Durchführung auf Synthesegerät, mit Analytik
- 2) Durchführung auf Synthesegerät, mit NPS-Phe, Analytik

^x Mol% bzgl. auf Säule aufgetragenes, hydrolysiertes Bz-(Leu)₆

Tabelle 2

BA/AAE-Versuche mit BOC-Phe in 5 Simuliertcyclen

Substrat				
Typ	n	Mol-% Phe (Molare BA-Rate): +	Abspalt- ausbeute (%): ++	Bz-Peptid (%): +++
Bz-(Leu) _n -P	1	4,5 (2,7)	80 (93)	74 (62)
	3	11,8	92	35
	5	5,5	103	41
Ac-(Leu) _n -P	2	2,9 (1,3)	118 (109)	57 (56)
	3	1,6	96	69
	4	2,7 (2,1)	104 (109)	63 (55)
	5	1,6	100	64
	6	6,7 (8,0)	102 (99)	33 (35)

- + bezieht sich auf nicht hydrolysiertes Irr-(Leu)_n
- ++ Gewicht des rohen Abspaltproduktes bezogen auf das theoretisch bei Abwesenheit von Nebenreaktionen erwartete Benzoyl-Acetyl-Peptid.
- +++ Eluatgewicht nach Filtration über Dowex 50 W x 2 bezogen auf das zur Filtration eingesetzte Totalgewicht.
- Die Ergebnisse der Parallelversuche sind in Klammern gesetzt.

Das Ausmass der Backbone-Acylierung bei anderen Peptidsubstraten lässt sich nur vermuten. Es muss wesentlich höher als im Falle der Oligoleucine sein. Denn die Amidbindungen der Leucin-Peptide sind wegen der Isobutyl-Gruppe sehr schlecht zugänglich. Trotzdem wird im Falle von Bz-(Leu)₃ bei 5 Simuliertkupplungen wenigstens jede 10-te harzfixierte Peptidkette backbone-acyliert.

Interessanterweise kann bei den Acetyloligoleucinen eine Erhöhung der Einlagerungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Anzahl Peptidbindungen, also eine Erhöhung der molaren BA/AAE-

Rate beobachtet werden. Bei den Benzoylpeptiden liegt das Maximum der molaren Einlagerungsrate beim Tripeptid. Für diese Unterschiede könnten 2 verschiedene Faktoren verantwortlich sein:

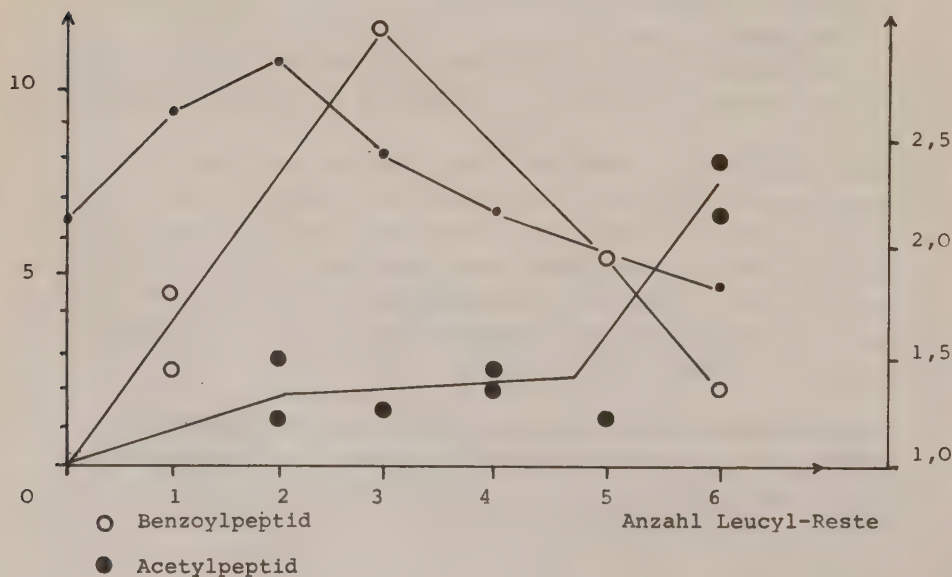
1. Unterschiedlicher Einfluss der Benzamid- und Acetamid-Gruppe auf die Backbone-Acylierung
2. Abhängigkeit der Backbone-Acylierung von allfälligen Sekundärstrukturen oder Assoziatbildungen der Substrate.

Ein Hinweis auf die Existenz der in 2. angeführten Phänomene ist in den unterschiedlichen Quellverhalten der BOC-Oligoleucyl-Polymere zu suchen.

Einlagerungsrate in Abhängigkeit der Leucyl-Reste

Mol-% eingelagertes Phenylalanin
nach 5 Synthesecyclen

Volumenquellung von BOC-Oligo-
Leucyl-Polymeren in CH_2Cl_2
(ml CH_2Cl_2 /g Polymer)



Experimenteller Teil

1. Analytik

1.1. Harz-Analytik

1.1.1. 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd-Methode nach Esko ³⁰

Methode: 0,1-1,5 μMol freies Resinopeptid lässt man in einem Frittenröhrchen mit 1 ml einer 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd-Lösung (0,05 M in abs. EtOH) 15 h bei Zimmertemperatur reagieren. Das überschüssige Reagenz wird durch mehrfaches Auswaschen mit total 30 ml CH_2Cl_2 entfernt. Nun lässt man so lange frisch hergestellte Benzylamin-Lösung (0,4 M in CH_2Cl_2) durchlaufen, bis Harz und Lösung farblos sind. Die Filtrate werden mit der Benzylamin-Lösung auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und bei $\lambda_{\text{max}} = 424 \text{ nm}$ spektroskopisch ausgemessen.

Eichkurve: Benzylamin-Stammlösung: 42,9 g (0,4 Mol) Benzylamin (frisch destilliert) werden in CH_2Cl_2 gelöst und auf einen Liter aufgefüllt. In dieser Lösung werden steigende Mengen 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd gelöst und spektroskopisch ausgemessen.

Eichreihe: 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd in 0,4 M Benzylamin/ CH_2Cl_2

Molarität ($\mu\text{Mol/l}$):	Extinktion $E_{\text{max}} = 424 \text{ nm}$:
0,0824	0,532
0,0412	0,266
0,01648	0,109
0,0065	0,042
0,0041	0,028

Reproduzierbarkeitsversuche: Die Reproduzierbarkeitsversuche werden an Leucyl-Harzen nach obiger Vorschrift durchgeführt.

Bestimmung der Blindwerte: Die Bestimmung der Blindwerte wird an Hydroximethyl-Harzen ausgeführt. Hierfür werden 3 Parallelversuche mit je ca. 1-2 g Harz angesetzt. Es werden keinerlei Blindwerte gefunden.

Beladungsanalyse bei der Hexaleucyl-Synthese: Zur Bestimmung der Totalbeladung werden 3 mg entschütztes, für die Bestimmung der Restbeladung 20-40 mg geschütztes Leucyl- bzw. Hexaleucyl-Harz angesetzt. Die Harzproben werden mit 1 ml 2-Hydroxi-1-naphtaldehyd-Lösung (0,5 m und 0,05 m in EtOH/CH₂Cl₂) umgesetzt. Die Hexaleucyl-Harze sind im Gegensatz zu den Leucyl-Harzen selbst nach 5 -stündiger Reaktion mit Benzylamin nicht völlig entfärbt.

1.1.2. Ninhydrin-Test nach Kaiser ³⁶

Lösungen:

- I. 500 mg Ninhydrin in 10 ml EtOH (abs.)
- II. 80 mg Phenol in 20 ml EtOH (abs.)
- III. 2 ml einer 0,001 M KCN-Lösung mit Pyridin auf 100 ml auffüllen.

Modifizierter Test für kleine Mengen:

Eine Mikrospatelspitze Harz wird in ein Glühröhrchen eingefüllt. Dazu gibt man 10 µl CH₂Cl₂ und je 20 µl der obigen Lösungen. Die Röhrchen werden auf eine Gummiplatte gesteckt und ca. 5 min unter heftigem Vibrieren mit Dampf geheizt.

Indikation:

- a) keine NH₂-Gruppen vorhanden: Harz: weiss-Lösung: gelb

- b) wenig NH_2 -Gruppen vorhanden: Harz: leicht blau,
Lösung: dunkelblau
- c) viel NH_2 -Gruppen vorhanden: Harz: dunkelblau,
Lösung: dunkelblau.

1.1.3. Restbeladungsbestimmung nach Dorman ²⁹

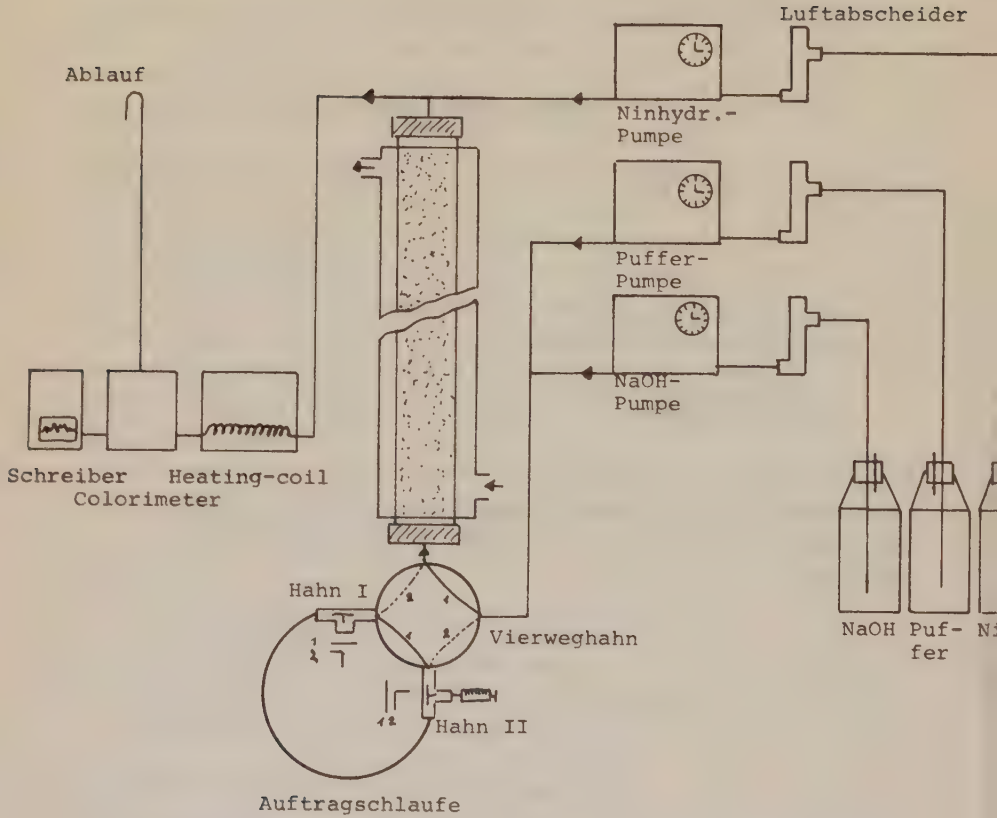
Vg. 2.5., Schritt 10 - 16.

1.2. Aminosäure-Analytik ⁴⁸

1.2.1. Analysenapparatur

Die Apparatur, mit welcher die Aminosäure-Analysen ausgeführt wurden, - ein modifizierter Analysator nach Stein und Moore ^{39,40,41} - ist in der folgenden Darstellung abgebildet.

Apparat zur Aminosäure-Analyse



Genaue Daten der Einzelteile:

Säule:

Masse: 150 cm x 0,9 cm

Adsorbens: Amberlite IR 120, auf 50°C thermostatisiert.

Pumpen:

Leistung: Ninhydrin-P.: 15 ml/h

Puffer-P. : 30 ml/h

NaOH-P. : maximale Leistung (ca. 30 ml/h)

Heating-coil: Teflon-Schlauch, Länge ca. 35 m

Colorimeter: Zum Teil Eigenbau, 2 Wellenlängen: 570 m μ , 440 m μ

Schreiber: Philipps-Zwölfpunktedrucker

Verbindungsschläuche: Teflon

Auftragschlaufe: Teflon

Volumen: 1,033 ml

Auftragmenge: ca. 0,5-2 μ Mol Aminosäure

1.2.2. Analysen-Prozedur

Bevor mit dem Analysenlauf begonnen werden kann, muss die Säule ca. 3 Stunden mit Puffer pH 4,25 äquilibriert werden. Nun kann die Probe aufgetragen werden. Die Schlaufe muss entleert und getrocknet werden. Dazu werden der Vierweghahn auf Stellung 1, der Dreiweghahn I auf Stellung 2 und der Dreiweghahn II auf Stellung 2 gebracht. Mit einer Spritze wird Aceton in die nun offene Schlaufe gepresst und anschliessend mit Vakuum getrocknet. Eine weitere Spritze, gefüllt mit der Analysenlösung, wird auf den Dreiweghahn II aufgesteckt und die Schlaufe mit dem Analysengut gefüllt. Es ist unbedingt darauf zu achten, dass die Schlaufe frei von Luftblasen ist. Dreiweghahn I und II werden geschlossen (Stellung 1), der Vierweghahn gleichzeitig in Stellung 2 gebracht. Nach ca. 10 Minuten ist die Schlaufe vollständig mit Puffer durchgespült, so dass der Vierweghahn wiederum in Stellung 1 gebracht werden kann. Die Pufferpumpe wird

während der Auftrageprozedur nicht abgestellt.

Unser Problem besteht im quantitativen Nachweis von Phe neben Leu in einem Molverhältnis von etwa 1:600. Die Retentionsvolumina dieser beiden Aminosäuren liegen so weit auseinander, dass eine Trennung ohne weiteres gelingt (das Retentionsvolumen von Leu ist kleiner als das Retentionsvolumen von Phe). Jedoch darf das Ninhydrin-Reagenz nicht mit dem Leu zur Reaktion kommen, da sonst wegen der zu grossen Konzentration der Aminosäure und demzufolge auch des gebildeten Farbstoffes die Teflonschläuche verstopft werden würden. Daher darf die Ninhydrin-Pumpe erst eingeschalten werden, wenn Leu das Heatingcoil passiert hat. Dies kann einfach durch entsprechende Schaltuhren geregelt werden. Die Ninhydrin-Pumpe schaltet ca. 8 Stunden nach der Probeaufgabe ein, sodass der Phe-Peak mit einer Retentionszeit von 10 Stunden noch sicher erfasst wird. 12 Stunden nach Probeaufgabe schalten Puffer- und Ninhydrin-Pumpe aus, die NaOH-Pumpe ein. Wenn die Natronlauge ca. $\frac{2}{3}$ der Säule passiert hat (die Front ist deutlich sichtbar), wird die NaOH-Pumpe aus-, die Puffer-Pumpe eingeschalten. Nach 3 -stündigem Äquilibrieren mit Puffer pH 4,25 ist die Säule für die nächste Analyse bereit. Die Probenaufgabe mit Hilfe der Schlaufe besitzt gegenüber der Probenaufgabe mit einer Pipette zwei wesentliche Vorteile:

1. werden die Volumina gut reproduzierbar abgemessen,
2. wird das Adsorbens durch die Aufgabenprozedur nicht aufgewirbelt, was selbst bei vorsichtigem Auftragen mit einer Pipette passieren kann.

1.2.3. Reagenzien

Puffer pH 4,25

Man löst 168 g Zitronensäure $\times$ H_2O (p.A.), 28 g NaCl (p.A.)

und 8 g Phenol in ca. 500 ml H_2O . Nach Zugabe von 280 ml 4 N NaOH wird auf 8 l aufgefüllt. Es ist nicht erforderlich, das pH des Puffers genau einzuregulieren, da die Retentionsvolumina von Phe und Leu jeweils bei Verwendung eines neuen Puffers frisch bestimmt werden.

4 N Na-Acetat-Puffer

1088 g NaOAc x $\frac{1}{2}$ H_2O (p.A.) werden in ca. 800 ml H_2O auf dem Dampfbad unter ständigem Rühren gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur werden 200 ml Eisessig (p.A.) zugegeben. Man füllt mit H_2O auf 2 l auf.

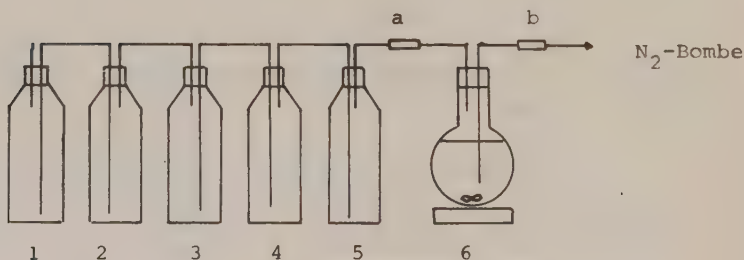
Ninhydrin-Lösung

Die zur Herstellung der Ninhydrin-Lösungen verwendeten Glasgefäße werden mit dest. H_2O und verd. HCl ausgespült und im Ofen getrocknet.

Methode 1: Eine Mischung von 112,5 ml Methylcellosolve (p.A.) und 37,5 ml 4 N Na-Acetat-Puffer (s.o.) werden ca. 15 min mit N_2 (99,99 %) gespült. Danach werden 3 g Ninhydrin (p.A.) unter Rühren zugegeben. Wenn sich das Ninhydrin gelöst hat, gibt man 86 mg $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (p.A.) zu. Es bilden sich braune Schlieren, die jedoch in wenigen Minuten wieder verschwinden. Die Lösung wird unter Stickstoff gut verschlossen und noch ca. 1 Stunde weitergerührt. Man erhält eine klare, gelbe Lösung.

Methode 2: Zu 3 g Ninhydrin und 86 mg $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ werden 112,5 ml Methylcellosolve und 37,5 ml Na-Acetat-Puffer unter Rühren zugegeben. Die Lösung wird unmittelbar nach der Puffer-Zugabe hellbraun, wird jedoch im Verlaufe einer Stunde hellgelb.

Methode 3 : Die Ninhydrin-Lösung wird bereits während ihrer Herstellung durch das unten beschriebene Flaschensystem vollständig von der Luft abgeschlossen. Flasche 1 und 3 enthalten ausgekochtes mit N_2 gesättigtes Wasser. Flasche 5 ist die Vorratsflasche, die via Verschraubung an die Pumpleitung der Ninhydrin-Pumpe angeschlossen wird. In den Rundkolben 6 werden 1225 ml Methylcellosolve und 375 ml Na-Acetat-Puffer vorgelegt. Man leitet 1/2 - 1 Stunde Stickstoff (puriss.) ein. Nach Zugabe von 30 g Ninhydrin unter ständigem Rühren werden mit einer Pipette 3,75 ml 14,5 bis 15,5 %- ige $TiCl_3$ -Lösung zugetropft. Die Lösung verfärbt sich momentan dunkelrot. Nach 1/2 -stündigem Einleiten von Stickstoff und Rühren wird die Lösung jedoch wieder ganz schwach gelb. Sie wird in die Vorratsflasche 5 übergeführt, indem man die Verschraubungen a und b vertauscht und Stickstoff einbläst.



1.2.4. Aminosäure-Analysen der Hydrolysate von nachbehandeltem Irr-(Leu)_n (8.2.)

Die Hydrolysate der ursprünglich s Simuliercyclen mit BOC-Phe unterworfenen Irr-(Leu)_n (8.2.) werden am Rotationsverdampfer eingedampft und in 3 bzw. 4 ml Puffer (pH 4,25) aufgenommen. In der Regel wird 1 ml der Lösung zur Analyse auf die Säule aufgetragen.

Aminosäure-Analysen der Hydrolysate von:

1) nachbehandeltem Bz-(Leu)₆ (8.2.)

Simuliercyclen, s = :	Simulierkupp- lungsdauer (h):	aufgetragene Menge (uMol) ⁺ :	gefundene Men- ge Phe (uMol):	Mol-% Phe ⁺ :
5	15	20	0,49	2,5
1	5 Tage	18,5	0,19	1
1	15	16	Spur	-
5	15 ++	20,3	0,16	0,8
5	15 +++	19	0,22	1,2

⁺ Die Mengen- bzw. Prozentangaben beziehen sich auf nicht hydrolysiertes Bz-(Leu)₆

⁺⁺ mit Analytik

⁺⁺⁺ Simulierkupplung mit NPS-Phe, Analytik

2) nachbehandeltem Irr-(Leu)_n (8.2.)

Irr= :	n= :	aufgetragene Menge (uMol) ⁺ :	gefundene Men- ge Phe (uMol):	Mol-% Phe:
Bz	1	53,8	1,48	2,8
Bz	1	17,6	0,8	4,5
Ac	2	55	1,61	2,9
Ac	2	55,1	0,96	1,7
Ac	3	23,8	0,37	1,6
Bz	3	30,4	3,7	12,1
Ac	4	50	1,0	2,0
Ac	4	51	1,4	2,8
Ac	5	18,2	0,29	1,6
Bz	5	29,5	1,6	5,5
Ac	6	4,5	0,3	6,7
Ac	6	4,0	0,45	8,3

⁺ Die Mengen-bzw. Prozentangaben beziehen sich auf nicht hydrolysierte Irr-(Leu)_n

Jede Simulierkupplungsdauer sämtlicher in 2) erwähnten Proben betrug 15 Stunden.

- 3) einem synthetischen Gemisch aus freien und geschützten Peptiden (7.9.)

21 mg des in 7.9. erhaltenen Filtrates werden nach dem in 8.2. beschriebenen Verfahren zur Hydrolyse eingesetzt.

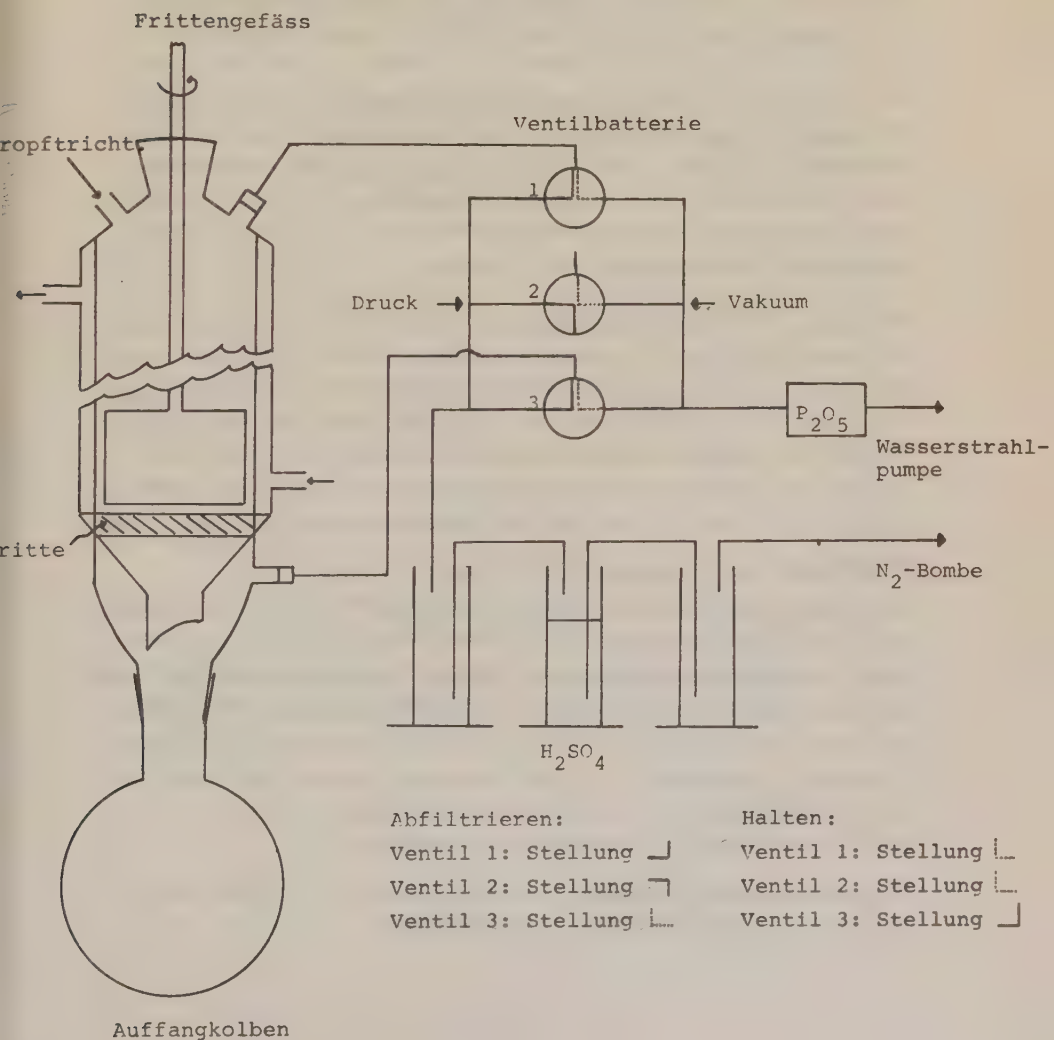
Im Hydrolysat kann kein Phe nachgewiesen werden.

Auswertung der Chromatogramme

Durch Multiplikation der Halbwertsbreite mit der Peakhöhe wird der sog. Farbwert für eine bestimmte Menge Aminosäure errechnet. Da es auf Grund der Instabilität der Ninhydrinlösung nicht einfach ist, einen konstanten Farbwert zu erhalten, wird jeweils nach der Aufgabe der Analysenprobe im Abstand von 2 Stunden eine definierte Menge Aminosäure aufgegeben. Dieser Farbwert wird für die zu bestimmende Menge Phenylalanin als Standard herangezogen.

2. Synthese von Oligoleucinen und deren Derivaten

2.1. Apparatur



2.2. Lösungsmittel, Reagenzien

Das Chloroform (techn.) wird über Nacht mit CaCl_2 geschüttelt, abfiltriert und anschliessend destilliert. Zur Trocknung sämtlicher Lösungsmittel gibt man ca. 10 g Molekularsieb (4 Å) pro Liter zu. Nach einer Stunde ist der Trocknungsprozess beendet. Die Lösungsmittel werden unmittelbar vor dem Gebrauch filtriert. Das Methylenchlorid (purum) wird unmittelbar nach der Destillation über eine Säule mit Molekularsieb filtriert. Bei Trocknung mit 10 g Molekularsieb pro Liter enthält das Methylenchlorid nur noch 0,2 % Wasser. Eine Steigerung der Molekularsieb-Menge auf 50 g pro Liter ändert den Wassergehalt nicht mehr.

Durch Filtration des Dioxan (purum) über eine mit Molekularsieb gefüllte Säule wird das Lösungsmittel zunächst getrocknet. Anschliessend werden die Peroxide durch Passieren einer Alox-Säule (neutral) aus dem Lösungsmittel entfernt. Bei Zugabe einiger Tropfen KI-Lösung muss das Lösungsmittel mindestens eine Minute absolut farblos bleiben. Eine Gelbfärbung deutet auf das Vorhandensein von Peroxiden.

Triäthylamin, Pyridinhydrochlorid: Puriss. (Fluka)

4 N HCl/Dioxan: Aus einer Bombe wird über H_2SO_4 konz. getrocknetes HCl-Gas in Dioxan (ca. 0,5-1 l) eingeleitet. Die Vorlage muss gut gekühlt werden, da sich das Lösungsmittel stark erwärmt, und die Löslichkeit des HCl-Gases sich infolgedessen sehr verringert. Der Gehalt an HCl in Dioxan wird durch laufende Titrationsen mit NaOH bestimmt. Vorteilhafterweise wird eine wesentlich konzentriertere Lösung hergestellt und auf die erforderliche Normalität verdünnt.

BOC-Leucin/ CH_2Cl_2 (0,2 M): 49,8 g (0,2 Mol) BOC-Leu werden in CH_2Cl_2 gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

BOC-Phenylalanin/CH₂Cl₂ (0,2 M): 53,0 g (0,2 Mol) BOC-Phe werden in CH₂Cl₂ gelöst und auf 1 l aufgefüllt.

NPS-Phenylalanin/CH₂Cl₂ (0,2 M): 6,36 g (0,02 Mol) NPS-Phe-OH werden in CH₂Cl₂ gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.

Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI)/CH₂Cl₂ (3 M): 6,19 g (0,03 Mol) DCCI werden in CH₂Cl₂ gelöst und auf 10 ml aufgefüllt.

Bestimmung des H₂O-Gehaltes in Lösungsmitteln: 0,5 ml des Lösungsmittels werden mit KF-Reagenz austitriert. Diese Methode ist zur Bestimmung des H₂O-Gehaltes sämtlicher Lösungsmittel (außer TFA) geeignet.

Bestimmung des H₂O-Gehaltes in TFA: Die direkte Titration von TFA mit KF-Reagenz führt zu keinem Erfolg, da der Endpunkt innerhalb von 60 Sek. nicht stabil bleibt. Deshalb werden zuerst 0,4 ml (= 0,76 mMol) Pyridin austitriert, und dann erst 0,5 ml (= 0,65 mMol) TFA zugegeben. Nun lässt sich der Endpunkt exakt bestimmen.

2.3. Synthese von BOC-(Leu)₆-P

Ca. 30 g getrocknetes BOC-Leu-P (Herkunft: P. Fankhauser) wurden in einem 1 l Frittengefäß durch 5-faches Wiederholen des folgenden Synthesecyclus zu BOC-(Leu)₆-P umgesetzt. Als Träger (P) wurde ein Copolymer aus Styrol und 2 % Divinylbenzol verwendet.

Synthesecyclus für die Synthese von BOC-(Leu)₆-P

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 450	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	450	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	450	2 h
4	spülen	Dioxan	10 x 450	-
5	spülen	CHCl ₃	3 x 450	-
6	neutralisieren	CHCl ₃ /NEt ₃ (9:1/v:v)	3 x 450	5 min
7	spülen	CHCl ₃	3 x 450	-
8	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 450	-
9	Kupplung	0,2 M BOC-Leu/ CH ₂ Cl ₂	450	15 h
		3 M DCCI/CH ₂ Cl ₂	30	
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 450	-

Die Fraktionen 6 und 7 jeder Synthesestufe wurden eingedampft und in 250 ml H₂O gelöst. Den Chlorid-Gehalt ermittelte man durch potentiometrische Titration von Proben à 25 ml mit 0,1 N AgNO₃.

Umsatzanalytik der Synthese von BOC-(Leu)₆-P

Synthesestufe:	Verbrauch ml 0,1 N AgNO ₃ :	Totalbeladung uMol/g: +	Restbeladung uMol/g: +++
1	17,25	576	-
2	17,27	575/17 ⁺⁺	-
3	17,20	573	-
4	17,20	573	-
5	17,20	573	53

- + Die Beladungswerte geben die Anzahl freier Aminogruppen pro Gramm ursprünglich eingesetztem BOC-Leu-P an
- ++ Die Neutralisationsprozedur (Schritt 6 und 7) wurde wiederholt. Der erhaltene Chloridwert ist vermutlich vorwiegend Blindwert.
- +++ Nach der Dorman-Methode bestimmt.

2.4. Synthese von BOC-(Leu)_n-P (n = 2-6)

In 25 ml Frittenrohren werden je ca. 1,6 g getrocknetes BOC-Leu-P (Herkunft: P. Fankhauser) durch (n-1) -faches Wiederholen des nachfolgenden Synthesecyclus zu BOC-(Leu)_n-P umgesetzt. Die Umsatzbedingungen sind mit denen der vorigen Synthese (2.3.) identisch. Auf analytische Verfolgung der Synthese wurde daher verzichtet.

Synthesecyclus für die Synthese von BOC-(Leu)_n-P

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 20	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	20	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	20	2 h
4	spülen	Dioxan	3 x 20	-
5	spülen	CHCl ₃	20	-
6	neutralisieren	CHCl ₃ /NEt ₃ (9:1/v:v)	3 x 20	5 min
7	spülen	CHCl ₃	3 x 20	-
8	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 20	-
9	Kupplung	0,2 M BOC-Leu/CH ₂ Cl ₂ 3 M DCCI/CH ₂ Cl ₂	20 1,33	15 h
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 20	-

Sämtliche Synthesen wurden doppelt ausgeführt, sodass jeweils zwei Produkte der Resinooligoleucine vorliegen.

2.5. Synthese von BOC-Phe-(Leu)₆-P

Ca. 0,5 g (ca. 3 ml in CH₂Cl₂ flottiert) BOC-(Leu)₆-P (2.3.) wurde entsprechend dem folgenden Syntheschema zu BOC-Phe-(Leu)₆-P umgesetzt.

Synthesecyclus für die Synthese von BOC-Phe-(Leu)₆-P

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	vorquellen	4 N HCl/Dioxan	10	5 min
2	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	10	2 h
3	spülen	Dioxan	10 x 10	-
4	spülen	t-BuOH/Dioxan (2:1/v:v)	4 x 10	-
5	neutralisieren	NEt ₃ /t-BuOH/Dioxan (1:6:3/v:v:v)	3 x 10	-
6	spülen	t-BuOH/Dioxan (2:1/v:v)	3 x 10	-
7	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 10	-
8	Kupplung	0,2 M BOC-Phe 3 M DCCI/CH ₂ Cl ₂	10 0,66	15 h
9	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 10	-
10	spülen	CHCl ₃	3 x 10	-
11	beladen	0,3 M Py-HCl/CHCl ₃	3 x 10	-
12	spülen	CHCl ₃	3 x 10	-
13	spülen	t-BuOH/Dioxan (2:1/v:v)	4 x 10	-
14	neutralisieren	NEt ₃ /t-BuOH/Dioxan (1:6:3/v:v:v)	3 x 10	-
15	spülen	t-BuOH/Dioxan (2:1/v:v)	3 x 10	-
16	spülen	CH ₂ Cl ₂	2 x 10	-

Umsatzanalytik

Die argentometrische Titration der Filtrate der Stufen 5 und 6 ergab 222 μMol , die der Stufen 14 und 15 4 μMol freies Amin.

2.6. Synthese von Bz-(Leu)₂

1 ml Pyridin und 14 μl BzCl (0,12 mMol) wurden vorgelegt. Unter Rühren wurden 26 mg (0,1 mMol) (Leu)₂ langsam zugegeben. Da nach 20 -stündiger Reaktionszeit dünnschicht-chromatographisch noch freies Dileucin nachgewiesen werden konnte, gab man weitere 28 μl BzCl zu. Nach insgesamt 23 Stunden Reaktionszeit wurde das Produkt zwischen je 8 ml gesättigter Bicarbonat-Lösung und Essigester (3 Portionen) verteilt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase (Trübung) wurde diese mit 3 Portionen Essigester extrahiert. Nach 1 -stündiger Trocknung über Na₂SO₄ dampfte man den Essigester ab und erhielt ca. 20 mg Rohprodukt. Säulenchromatographische Untersuchungen an LH 20 zeigten ein Verhältnis Benzoesäure/Benzoyldileucin von 2 : 1. Für unsere weitere Untersuchungen genügte dieses Rohprodukt.

2.7. Synthese von NPS-Phe

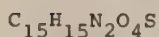
13,21 g (80 mMol) Phe wurden in einer Mischung aus 40 ml 2 N NaOH und 100 ml Dioxan gelöst. Innert 45 min gab man abwechselnd o-Nitrophenylsulfonylchlorid (NPS-Cl) (total 16,68 g, = 88 μMol) und 2 N NaOH (total 32 ml) in kleinen Portionen zu. Die intensive Rotfärbung unmittelbar nach der Zugabe von NPS-Cl hellte sich bei kräftigem Rühren nach wenigen Minuten auf. Nachdem die letzte Portion NPS-Cl zugege-

ben war, wurde noch weitere 10 min gerührt. Die bei Zugabe von 800 ml H_2O entstandene Trübung konnte durch Filtration über Hyflow-Gel erfolgreich entfernt werden. Nun wurde die Lösung unter kräftigem Rühren zwischen 500 ml Essigester und 200 ml $\text{KHSO}_4/\text{K}_2\text{SO}_4$ -Puffer (gesättigt) verteilt. Die wässrige Phase wurde in einem Scheidetrichter 3 mal mit je 500 ml Essigester extrahiert. Diesen trocknete man nach Neutralwaschen ca. 45 min über Na_2SO_4 . Nach Eindampfen erhielt man ein hellbraunes Öl, das bei Trocknung am Hochvakuum (2 h, 50°C) kristallisierte.

Ausbeute: 13,1 g (52 %).

Das Produkt wurde in 230 ml Benzol heiss gelöst. Nach Zugabe von 200 ml CCl_4 liess man im Kühlschrank auskristallisieren. Schmelzpunkt: $128 - 132^\circ\text{C}$.

Elementaranalyse:



(318,79)

	C	H	N
gef.	56,61	4,62	8,62
ber.	56,60	4,43	8,80

3. Acylierungsreaktionen

3.1. Freisetzung von (Leu)₆-P aus BOC-(Leu)₆-P (2.3.)

Ca. 1 g (= 7 ml in CH₂Cl₂ flottiert) BOC-(Leu)₆-P (2.3.)

Schutzgruppenabspaltung:

3 mal mit je 5 ml Dioxan spülen
in 5 ml 4 N/HCl 25 min quellen
in 5 ml 4 N/HCl 2 h abspalten
3 mal mit je 5 ml Dioxan spülen.

Freisetzung des Resinopeptides:

3 mal mit je 5 ml Dioxan spülen
3 mal mit je 5 ml NET₃/CHCl₃ (1:9/v:v) spülen
3 mal mit je 5 ml CHCl₃ spülen.

3.2. Umsetzung von (Leu)₆-P (3.1.) mit Ac₂O/NEt₃

Man liess ca. 5 - 10 mg (Leu)₆-P über Nacht mit 1 ml eines Gemisches aus Ac₂O/NEt₃/CH₂Cl₂ (1:1:10/v:v:v) reagieren. Nach mehrmaligem Auswaschen des Harzes mit CH₂Cl₂ wurden an diesen Ninhydrin-Teste (1.1.2.) (Doprelbestimmungen!) durchgeführt.

Farbe des Harzes: intensiv blau,

Farbe der Lösung: stark violett.

3.3. Umsetzung von (Leu)₆-P (3.1.) mit Ac₂O/Py

Die Prozedur ist der in 3.2. beschriebenen vollständig analog. Die Ninhydrin-Teste sind ebenfalls stark positiv.

3.4. Umsetzung von (Leu)₆-P (3.1.) mit BzCl/Py

Ansatz I:

Die Prozedur ist der in 3.2. beschriebenen vollständig analog. Die Ninhydrin-Teste sind schwach positiv.

Ansatz II:

Ca. 1 g HCl·H-(Leu)₆-P (3.1.) wurde wie folgt vorbehandelt:

6 mal mit je 5 ml Dioxan spülen

3 mal mit je 5 ml $\text{NEt}_3/\text{CHCl}_3$ (1:9/v:v) spülen

3 mal mit je 5 ml CHCl_3 spülen.

Die gesamte Menge an (Leu)₆-P liess man über Nacht mit 5 ml eines Gemisches aus BzCl/Py/ CH_2Cl_2 (1:1:10/v:v:v) reagieren. Die Probe wurde 5 mal mit je 5 ml CH_2Cl_2 und 2 mal mit je 5 ml CHCl_3 ausgewaschen. Die letzte Waschfraktion hinterliess auf dem Uhrglas keine Spuren eines Rückstandes mehr. Der Ninhydrin-Test zeigte eine schwach positive Reaktion.

Harz: farblos

Lösung: violett.

Ansatz III:

Ca. 5 g BOC-(Leu)₆ (32 ml in CH_2Cl_2 flottiert) wurden wie folgt vorbehandelt:

10 min in 30 ml 4 N HCl/Dioxan vorquellen

75 min mit 30 ml 4 N HCl/Dioxan abspalten

10 mal mit je 30 ml Dioxan spülen

3 mal mit je 30 ml CHCl_3 spülen

3 mal mit je 30 ml $\text{NEt}_3/\text{CHCl}_3$ (1:9/v:v) spülen

3 mal mit je 30 ml CHCl_3 spülen

Laut Titration der $\text{NEt}_3/\text{CHCl}_3$ - und der CHCl_3 -Waschfraktionen mit 0,1 N AgNO_3 liegen 2,72 mmol freies Resinopeptid vor. Die gesamte Menge Resinopeptid liess man über Nacht mit 30 ml einer Mischung aus BzCl/Py/ CH_2Cl_2 (1:1:4/v:v:v) reagieren.

Das kanariengelbe Harz wurde 5 mal mit je 30 ml CH_2Cl_2 und 3 mal mit je 30 ml CHCl_3 ausgewaschen. Laut Umsatzanalyse nach Dorman wurden $350 \mu\text{Mol}$ (= 13 %), nach den Ergebnissen der HCl-Methode $553 \mu\text{Mol}$ (= 20 %) nicht benzyliert.

Der Ninhydrin-Test zeigte eine ganz schwach positive Reaktion.

Harz: blau-grün,

überstehende Lösung: hellblau.

3.5. Umsetzung von $(\text{Leu})_6\text{-P}$ (3.1.) mit 3-Sulfopropionsäureanhydrid

Die Freisetzung von 1 g $(\text{Leu})_6\text{-P}$ aus BOC- $(\text{Leu})_6\text{-P}$ (2.3.) erfolgte nach der in 3.1. angegebenen Prozedur. 4,4 g (32 mMol) 3 Sulfopropionsäureanhydrid wurden in 33 ml Dioxan gelöst (Lösung I). 7,5 ml (60 mMol) N-Äthylmorpholin wurden in 15 ml Dioxan gelöst (Lösung II). Ca. 50 mg ($20 \mu\text{Mol}$) Resinopeptid liess man mit 0,5 ml (7 mMol) der Lösung I und 0,4 ml (15 mMol) der Lösung II über Nacht reagieren. Der nach Zusammengeben der beiden Lösungen I und II gebildete milchige Niederschlag konnte durch Zugabe einiger Tropfen DMF in Lösung gebracht werden. Nach der Reaktionszeit wurde die Probe filtriert, 4 mal mit abs. EtOH und 2 mal mit abs. (über $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ getrocknetem) AcOH gewaschen. Die Ninhydrin-Teste waren kräftig positiv.

Harz: dunkelbraun,

Lösung: dunkelblau.

Ein Schütteln während der Reaktion brachte keinen besseren Umsatz.

3.6. Umsetzung von (Leu)₆-P (3.1.) mit 3-Nitrophtalsäure-anhydrid

435 mg (2,25 mMol) 3-Nitrophtalsäureanhydrid wurden in 10 ml DMF gelöst (Lösung I). 1 ml NEt₃ wurden mit 5 ml DMF gemischt (Lösung II). Zu ca. 50 mg (Leu)₆-P (3.1.) gab man 0,5 ml der Lösung I zu. Nach etwa 3 Minuten wurden 0,1 ml der Lösung II zugetropft. Nach 3 -stündiger Reaktionszeit wurde die Probe filtriert und je 3 mal mit DMF, Dioxan, EtOH, AcOH ausgewaschen. Der Ninhydrin-Test war schwach positiv.

Harz: braun,

Lösung: blau.

3.7. Umsetzung von (Leu)_n-P (n = 1,3,5) (2.4.) mit BzCl/Py

Je ca. 1 g BOC-(Leu)_n-P (n = 1,3,5) (2.4.) wurden nach Abspaltung der BOC-Gruppe analog 3.1. in 25 ml Frittenrohren nach Vorschrift 3.4./III mit 20 ml BzCl/Py/CH₂Cl₂ (1:1:4/ v:v:v) umgesetzt. Die Probe mit n = 1 wurde doppelt geführt. Die Leucyl-Harze waren nach der Reaktion gelb, das Tripeptid- und das Pentapeptidharz stark rot-braun. Sämtliche Ninhydrin-Teste waren absolut negativ.

3.8. Umsetzung von (Leu)_n-P (n = 2-6) mit Acetimidazol

Je 1 g BOC-(Leu)_n-P (n = 2-6) (2.4.) wurde nach Abspaltung der BOC-Gruppe analog 3.1. in 25 ml Frittenrohren mit 15 ml einer Lösung von 1,023 g Acetimidazol (9,2 mMol) in 60 ml CH₂Cl₂ umgesetzt. Die Proben mit n = 2, 4 und 6 wurden

doppelt geführt. Die Resinopeptide wurden mehrmals mit je 20 ml CH_2Cl_2 ausgewaschen. Die Ninhydrin-Teste der Acetylpenta- und Acetylhexaleucylharze waren negativ, diejenigen der übrigen Resinopeptide positiv.

Sämtliche Resinopeptide wurden nochmals mit Acetimidazol umgesetzt. Diesmal wurde das Acylierungsgemisch wie folgt hergestellt: 6,484 g (28 mMol) 70 % -iges CBI wird in 40 ml CH_2Cl_2 gelöst (Lösung I). 1,76 ml (31 mMol) AcOH wurden in 20 ml CH_2Cl_2 gelöst (Lösung II). Beide Lösungen wurden langsam zusammengegeben. Nach ca. 30 min war die Acetimidazol-Bildung vollständig (IR !). Zur Acylierung wurden wiederum 15 ml des Acylierungsgemisches je Ansatz eingesetzt. Die Ninhydrin-Teste sind jetzt nur noch schwach positiv.

4. Simuliercyclen

4.1. Methode

Die benzoylierten, resp. acetylierten Resinopeptide (3.7. und 3.8.) wurden mehreren Synthesecyclen mit BOC-Phe, wie diese bei SP-Synthesen durchgeführt werden, unterworfen. Anfänglich wurden die diesbezüglichen Operationen in der unter 2.1. beschriebenen Apparatur vorgenommen (4.2.). Im späteren Verlauf konnten diese Simuliercyclen mit Hilfe eines automatischen Synthesegerätes durchgeführt werden (Diss. P. Fries).

Unter Totalbeladung verstehen wir im folgenden die Anzahl freier Aminogruppen nach der simulierten Schutzgruppenabspaltung, unter Restbeladung die Anzahl der freien Aminogruppen nach der Simulierkupplung.

4.2. Simuliercyclen an Bz-(Leu)₆-P mit BOC-Phe

30 ml (ca. 4 g) in CH_2Cl_2 flottiertes BOC-(Leu)₆-P (2.3.) wurden entsprechend dem nachfolgenden Schema umgesetzt.

Nach Zugabe der Kupplungsagenzien (Schritt 10 des ersten Simuliercyclen) wurde ca. 1/3 der Gesamtmenge aus dem Reaktionsgefäß herausgenommen. Man liess diesen Anteil 5 Tage lang unter Kupplungsbedingungen stehen. Danach wurden die Schritte 11 bis 7 durchgeführt. Dieses einer 5-tägigen Simulierkupplung unterworfenen Resinopeptid wollen wir mit 4.2./II bezeichnen.

Die sich im Reaktionsgefäß befindende Restmenge des Resinopeptides wurde entsprechend der beiden folgenden Schemata

2.-5. Simuliercyclus an BOC-(Leu)₆-P

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 30	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	30	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	30	2 h
4	spülen	Dioxan	3 x 30	-
5	spülen	CHCl ₃	3 x 30	-
6	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	3 x 30	-
7	spülen	CHCl ₃	3 x 30	-
8	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-
9	Kupplung	0,2 M BOC-Phe/CH ₂ Cl ₂	15	15 h
		3 M DCCI/CH ₂ Cl ₂	1	
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-

In Simuliercyclus 3 - 5 wurden - infolge Halbierung des Ansatzes - 15 ml Lösungsmittel für die Waschoperationen verwendet.

4.3. Simuliercyclen an Bz-(Leu)₆-P mit BOC-Phe auf automatischem Synthesegerät

Ca. 1,5 g BOC-(Leu)₆-P (2.3.) wurden entsprechend dem nachfolgenden Syntheschema umgesetzt. Zur Durchführung dieser Simuliercyclen stand ein automatisches Synthesegerät (4.1.) zur Verfügung. Dadurch wurde eine gleichzeitige analytische Verfolgung der Simuliercyclen ermöglicht.

Für die Synthesecyclen 2 - 5 galten die Schritte 1 - 16 des Syntheschemas unter Änderung des Schrittes 9. Für diesen gilt: Reagenz: 0,2 M BOC-Phe/CH₂Cl₂ (15 ml), 3 M DCCI/CH₂Cl₂ (1 ml).

bis zum Schritt 7 des 2. Simuliercyclus weiter behandelt. Jetzt wurde der Ansatz halbiert. Das dem Reaktionsgefäß entnommene Resinopeptid, welches also einer Simulierkupplung à 15 h ausgesetzt worden war, wollen wir mit 4.2./III bezeichnen.

Mit der anderen Hälfte wurden 4 weitere Simuliercyclen entsprechend dem nachfolgenden Schema vorgenommen. Dieses Produkt trägt die Bezeichnung 4.2./I.

1. Simuliercyclus an Bz -(Leu)₆-P

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 30	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	30	10 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	30	2 h
4	spülen	Dioxan	3 x 30	-
5	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃	3 x 30	-
6	spülen	CHCl ₃	3 x 30	-
7	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 30	-
8	Benzoylierung	BzCl/Py/CH ₂ Cl ₂ (1:1:4/v:v?v) ²	30	15 h
9	spülen	CH ₂ Cl ₂	5 x 30	-
10	Kupplung	0,2 M BOC-Phe/ CH ₂ Cl ₂ , 3 M DCCI/ CH ₂ Cl ₂	30 2	15 h
11	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 30	-

Simuliertzyclus an Bz-(Leu)₆-P mit BOC-Phe auf
Synthesegerät

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 15	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	15	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	15	2 h
4	spülen	Dioxan	10 x 15	-
5	spülen	CHCl ₃	6 x 15	-
6	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	4 x 15	-
7	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
8	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
9	Benzoylierung	BzCl/Py/CH ₂ Cl ₂ (1:1:4/v:v:v) ²	15	12 h
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-
11	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
12	beladen	0,3 M Py·HCl/CHCl ₃	3 x 15	-
13	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
14	spülen	CHCl ₃ (chlorid-frei)	3 x 15	-
15	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	3 x 15	-
16	spülen	CHCl ₃ (chlorid-frei)	3 x 15	-
17	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-
18	Kupplung	0,2 M BOC-Phe/CH ₂ Cl ₂ 3 M DCCI/CH ₂ Cl ₂	15 1	15 h
19	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-
20	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
21	beladen	0,3 M Py·HCl/CHCl ₃	3 x 15	-
22	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
23	spülen	CHCl ₃ (chlorid-frei)	3 x 15	-
24	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	3 x 15	-
25	spülen	CHCl ₃ (chlorid-frei)	3 x 15	-

Analytik: Die Filtrate der Fraktionen 6 (Totalbeladung) und 15/16 (Restbeladung) wurden in einer Vorlage mit verd. HNO_3 kontinuierlich argentometrisch titriert. Die Titrationsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Stufe:	Restbeladung (μMol):	Totalbeladung (μMol):
Edukt	-	703
Benzoyl-peptid	-	109
1. SC	42	27
2. SC	93	130
3. SC	93	-
4. SC	70	210
5. SC	62	144

SC = Simuliercyclus

4.4. Simuliercyclen an Bz-(Leu)₆-P mit NPS-Phe auf Synthesegerät (4.1.)

Ca. 2 g BOC-(Leu)₆-P (2.3.) wurden entsprechend dem nachfolgenden Syntheschema benzyliert und mit NPS-Phe umgesetzt. Auch für diese Simuliercyclen stand das Synthesegerät zur Verfügung, so dass wiederum eine gleichzeitige analytische Verfolgung der Operationen möglich war.

Die NPS-Schutzgruppe wurde mit einer Mischung von 1,3 ml 1 N HCl in AcOH und 13,7 ml CHCl_3 abgespalten. Zur Neutralisierung diente NET_3/DMF (1:9/v:v). Dieses Reagenz besitzt gegenüber $\text{NET}_3/\text{CHCl}_3$ den Vorteil, dass es keinen Chlorid-Bindwert besitzt, der bei jeder Analyse parallel bestimmt werden müsste.

Benzoylierung und 1. Simuliercyclus an Bz-(Leu)₆-P mit NPS-Phe auf Synthesegerät

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	2 x 70	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	30	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	30	2 h
4	spülen	Dioxan	10 x 30	-
5	spülen	CHCl ₃	3 x 70	-
6	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	3 x 30	-
7	spülen	CHCl ₃	3 x 30	-
8	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 30	-
9	Benzoylierung	BzCl/Py/CH ₂ Cl ₂ (1:1:4/v:v:v) ²	30	15 h
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 30	-
11	1. Simulierkupplung	0,2 M NPS-Phe/CH ₂ Cl ₂ 3 M DCCI	15 1	15 h
12	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 15	-
13	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
14	beladen	0,3 M Py·HCl/CHCl ₃	3 x 15	-
15	spülen	CHCl ₃	3 x 15	-
16	spülen	DMF	3 x 15	-
17	neutralisieren	NEt ₃ /DMF (1:9/v:v)	3 x 15	-
18	spülen	DMF	3 x 15	-

Nach Schritt 10 wurde der Ansatz halbiert.

Schritt 6 und 7: Bestimmung der Totalbeladung.

Schritt 17 und 18: Bestimmung der Restbeladung.

2.-5. Simuliercyclus

Schritt	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	CHCl_3	3 x 15	-
2	NPS-Abspaltung	$\text{HCl}/\text{AcOH}/\text{CHCl}_3$	15	10 min
3	spülen	CHCl_3	3 x 15	-
4	spülen	DMF	3 x 15	-
5	spülen	EtOH	3 x 15	-
6	spülen	CHCl_3	3 x 15	-
7	spülen	DMF	3 x 15	-
8	neutralisieren	NEt_3/DMF (1:9/v:v)	3 x 15	-
9	spülen	DMF	3 x 15	-
10	neutralisieren	NEt_3/DMF (1:9/v:v)	15	-
11	spülen	DMF	3 x 15	-
12	spülen	CH_2Cl_2	3 x 15	-
13	Kupplung	0,2 M NPS-Phe/ CH_2Cl_2 3 M DCCI/ CH_2Cl_2	15 1	15 h
14	spülen	CH_2Cl_2	3 x 15	-
15	spülen	CHCl_3	3 x 15	-
16	beladen	0,3 M Py/ HCl/CHCl_3	3 x 15	-
17	spülen	CHCl_3	3 x 15	-
18	spülen	DMF	3 x 15	-
19	neutralisieren	NEt_3/DMF (1:9/v:v)	3 x 15	-
20	spülen	DMF	3 x 15	-

Schritt 2 - 6: Fraktion 1 (Ausmessung von NPS-Cl)

Schritt 8 - 11: Fraktion 2 (Totalbeladung)

Schritt 13 - 15: Fraktion 3 (Ausmessung von NPS-Phe)

Schritt 19 - 20: Fraktion 4 (Restbeladung)

Analytik: Die Filtrate der Fraktionen 8 - 11 (Totalbeladung) und 19/20 (Restbeladung) wurden analog 4.3. kontinuierlich argentometrisch titriert. Die Titrationsergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Stufe:	Restbeladung (μMol):	Totalbeladung (μMol):
1. SC	74	22
2. SC	28	50
3. SC	30	39
4. SC	33	34

Bei der Schutzgruppenabspaltung wird NPS-Cl freigesetzt, das colorimetrisch ausgemessen werden kann ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$). Als Eichlösungen für die NPS-Cl-Bestimmungen dienten Lösungen von steigenden Mengen NPS-Cl in einem Lösungsmittelverhältnis, wie es in den Fraktionen 2 - 6 vorliegt. Die Mengen an gefundenem NPS-Cl sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Stufe:	NPS-Cl (μMol):
1. SC	3,3
2. SC	6,8
3. SC	5,0
4. SC	3,1

Auch das überschüssige, bei der Kupplungsreaktion nicht verbrauchte NPS-Phe ($\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$) kann spektrophotometrisch bestimmt werden. Die Eichlösungen für NPS-Phe wurden auf analoge Weise hergestellt. Es war zu erwarten, dass bei den Simulierkupplungen ca. 1 % (30 μMol) der total zur Simulierkupplung eingesetzten Menge an NPS-Phe verbraucht werden würde. Demgegenüber fand man in den Filtraten 13 - 15 nur noch zwischen 8 und 23 % des eingesetzten NPS-Phe.

4.5. Simuliercyclen an Bz-(Leu)_n-P (3.7.) und Ac-(Leu)_n-P
(3.8.) mit BOC-Phe

Je ca. 1 g Bz-(Leu)_n-P (n = 1, 3, 5) (3.7.) und Ac-(Leu)_n-P (n = 2-6) wurde manuell und ohne analytische Verfolgung 5 Simuliercyclen unterworfen (nachfolgendes Schema). Die Ansätze wurden doppelt geführt.

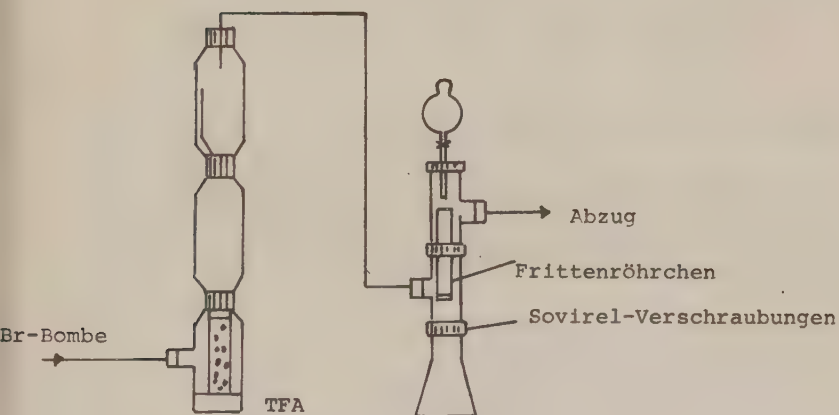
1.-5. Simuliercyclus für Irr-(Leu)_n-P (Irr = Bz, Ac)

Schritt:	Vorgang:	Reagenz:	Menge (ml):	Dauer:
1	spülen	Dioxan	3 x 20	-
2	spülen	4 N HCl/Dioxan	20	5 min
3	BOC-Abspaltung	4 N HCl/Dioxan	20	2 h
4	spülen	Dioxan	3 x 20	-
5	spülen	CHCl ₃	20	-
6	neutralisieren	NEt ₃ /CHCl ₃ (1:9/v:v)	3 x 20	-
7	spülen	CHCl ₃	3 x 20	-
8	spülen	CHCl ₃	3 x 20	-
9	Kupplung	0,2 M BOC-Phe/CH ₂ Cl ₂ 3 M DCCl/CH ₂ Cl ₂	20 1,33	15 h
10	spülen	CH ₂ Cl ₂	3 x 20	-

5. Ablösung der Peptide vom Harz

5.1. Methode

Apparatur zur HBr/TFA-Abspaltung



In Frittenrohren entsprechender Grösse liess man die Resinopeptide zunächst 1/2 h in Trifluoressigsäure (TFA) vorquellen. Danach leitete man für die Dauer von 2 h in leichtem Strom HBr-Gas ein. Das HBr-Gas wurde zuvor in einer Waschflasche mit TFA getrocknet. Durch diese Prozedur wurde gleichzeitig der Reaktionsraum mit TFA vorgesättigt. Nach beendeter Reaktion wurde abfiltriert und 3 mal mit TFA ausgewaschen. Nach Eindampfung der Proben am Rotationsverdampfer trocknete man sie über Nacht am Hochvakuum bei 70 °C.

5.2. Abspaltung von BOC-(Leu)₆-P (2.3.)

Harzproben der einzelnen Synthesestufen der Hexaleucin-Synthese (2.3.) zwischen 20 und 30 mg wurden in kleinen Frittenröhrchen in 0,5 ml TFA nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten. Die Ausbeuten betrugen zumeist mehr als 100 %. Offensichtlich enthielten sie noch grössere Mengen an TFA. Diese Proben wurden ausschliesslich für DC-Untersuchungen (9.1.) benötigt.

5.3. Abspaltung von Bz-(Leu)₆-P (3.4./III)

6,955 g Bz-(Leu)₆-P wurden in einem 40 ml Frittengefäss nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten. Nach Filtration wurde das abgespaltene Harz wie folgt ausgewaschen:

3 x mit je 30 ml TFA (zusammen mit dem 1. Filtrat:
Fraktion I)

3 x mit je 30 ml MeOH (Fraktion II)

3 x mit je 30 ml CH₂Cl₂ (Fraktion III)

1 x mit 30 ml TFA (Fraktion IV)

Nach diesen Waschprozeduren wurde die Abspaltung wiederholt. Es folgten wiederum Waschoperationen:

3 x mit je 30 ml TFA (Fraktion V)

3 x mit je 30 ml MeOH (Fraktion VI)

Ausbeuten:

Fraktion I : 2,52 g (130 % d.Th.) ⁺

Fraktion II : 81 mg

Fraktion III-V: unter 20 mg

Fraktion VI : 82 mg

⁺ Bezogen auf einen korrigierten Beladungswert von 433 µMol pro Gramm Bz-(Leu)₆-P. Diese Korrektur war infolge der Gewichtszunahme des Resinopeptides während der Synthese erforderlich.

Umrechnung auf Beladung pro Gramm Resinopeptid

$$x_m = \frac{x_{m_o}}{1 + MG_P \cdot x_{m_o} \cdot 10^{-6}}$$

x_m = Beladung pro Gramm Peptidharz (μMol)

x_{m_o} = Beladung pro Gramm Grundpolymer (= Anzahl Haftstellen)
(μMol)

MG_P = Molekulargewicht des auf dem Harz befindlichen Peptides

5.4. Abspaltung von SPA-(Leu)₆-P (3.5.)

Ca. 400 mg SPA-(Leu)₆-P (SPA = 3-Sulfofopronsäureanhydrid) wurden in einem Frittengefäß mit 5 ml TFA nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten (90 min Reaktionszeit).

Ausbeute: 148 mg (109 %)

5.5. Abspaltung von NPA-(Leu)₆-P (3.6.)

Ca. 400 mg NPA-(Leu)₆-P (NPA = Nitrophtalsäureanhydrid) wurden in einem Frittengefäß mit 5 ml TFA nach der in 5.1. beschriebenen Methode während 90 min abgespalten.

Ausbeute: 152 mg (108 %)

5.6. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆-P (4.2./I)

1,762 g nachbehandeltes Bz-(Leu)₆-P (4.2./I) wurden in einem Frittengefäß in 15 ml TFA 2 h nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 662 mg (115 %)

5.7. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆-P (4.2./II)

2,256 g nachbehandeltes Bz-(Leu)₆-P (4.2./II) wurden in einem Frittengefäß in 15 ml TFA 2 h nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 756 mg (100 %)

5.8. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆-P (4.2./III)

1,572 g nachbehandeltes Bz-(Leu)₆-P (4.2./III) wurden in einem Frittengefäß in 15 ml TFA 2 h nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 572 mg (109 %)

5.9. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆-P (4.3.)

1,018 g nachbehandeltes Bz-(Leu)₆-P (4.3.) wurden in einem Frittengefäß in 15 ml TFA 2 h nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 379 mg (115 %)

5.10. Abspaltung von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆-P (4.4.)

0,794 g nachbehandeltes Bz-(Leu)₆-P (4.4.) wurden in einem Frittengefäß in 15 ml TFA 2 h nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 240 mg (91 %)

5.11. Abspaltung von nachbehandeltem Irr-(Leu)_n-P (4.2.-4.5.)

Die Resinopeptide (4.2.-4.5.) wurden in Frittenrohren in 15 ml TFA 2 h abgespalten. Anschliessend wurden die Proben 2 mal mit je 15 ml TFA gewaschen. Die weitere Aufarbeitung der Filtrate erfolgte nach der in 5.1. beschriebenen Methode. Ansätze und Ausbeute sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Abspaltung von Irr-(Leu)_n-P mit HBr/TFA

Irr=	n=	Einwaage (g):	Rohprodukt (g):	Beladung/g Peptidharz (uMol): ⁺	% der Theorie:
Bz	6	1,762	0,662	433	115
Bz	6	2,256	0,756	433	100
Bz	6	1,572	0,572	433	109
Bz	6	1,018	0,379	433	115
Bz	6	0,794	0,240	433	91
Bz	1	1,102	0,126	574	90
Bz	1	0,913	0,090	574	78
Ac	2	0,975	0,171	537	116
Ac	2	1,209	0,195	537	106
Ac	3	1,148	0,220	507	95
Bz	3	1,156	0,293	507	93
Ac	4	1,397	0,371	480	109
Ac	4	1,341	0,339	480	104
Ac	5	1,412	0,400	455	101
Bz	5	1,455	0,390	455	90
Ac	6	1,057	0,341	433	101
Ac	6	0,742	0,233	433	98

Die Reaktionszeit betrug bei allen Proben 2 h.

⁺ Berechnet aus Umrechnungsformel 5.3. Die Beladung pro Gramm Grundpolymer (Haftstellen) errechnet sich aus den Beladungsanalysen von 2.3. zu 620 uMol pro Gramm.

5.12. Abspaltung von BOC-Phe-(Leu)₆-P (2.5.)

Ca. 0,5 g BOC-Phe-(Leu)₆-P (2.5.) wurden in 10 ml TFA nach der in 5.1. beschriebenen Methode abgespalten.

Ausbeute: 211 ml (75 %)

6. Reinigung und Charakterisierung der beiden Bz-(Leu)₆- Fraktionen (7.2./III) und (7.2./IV)

Das im folgenden verwendete Lösungsmittel Trifluoräthanol werde mit "TFE" abgekürzt.

6.1. Säulenchromatographie an LH 20

Das Adsorbens wurde durch mehrfaches Waschen mit MeOH in einem Becherglas in das Lösungsmittel übergeführt. Zum Füllen der Säule (150 cm x 0,9 cm) wurde ein ca. 20 cm langes Glasrohr mit etwa demselben Durchmesser auf die Säule aufgesetzt. Man verschloss zunächst den Säulenausgang und füllte zu etwa 2/3 mit MeOH auf. Nun goss man das in MeOH aufgeschlemmte Adsorbens in einem dünnen Strahl ein und öffnete gleichzeitig den Auslauf. Man achtete darauf, dass die Säule in einem Guss gefüllt wurde, und keine Luftblasen oder sonstige Inhomogenitäten auftraten.

3 mg des über Dowex 50 W x 2 vorgereinigten Bz-(Leu)₆ (7.2./III) wurden auf die Säule aufgegeben und mit MeOH eluiert (vgl. theoret. Teil

Je 3 mg von 7.2./III und 7.2./IV wurden nacheinander auf der LH 20 Säule in TFE/MeOH (1:6/v:v) chromatographiert. Die Eluat-Fractionen wurden im UV-Detektor (Uvicord) ausgemessen.

6.2. Äquivalentgewichtsbestimmung

27 mg Bz-(Leu)₆ (33,1 µMol) (7.2./IV) wurden in 20 ml TFE/MeOH (1:6/v:v) unter Erwärmen gelöst. Bei der Titration mit 0,1 N NaOH wurden 6,5 µMol NaOH verbraucht. Dies entspricht etwa 20 % freier Säure.

7. Filtration über Dowex 50 W x 2

7.1. Methode

Die rohen Abspaltprodukte wurden durch Filtration über das Sulfosäure-Harz Dowex 50 W x 2 (200-400 Mesh) gereinigt. Bevor die Austauschersäule bereitete werden konnte, musste das Harz gewaschen werden. Hierfür wurden die folgenden Waschprozeduren 5 mal wiederholt: Ca. 5 g Harz wurden mit je 100 ml 2 N HCl, H₂O, 2 N NaOH, H₂O in einem Becherglas durch jeweiliges Abdekantieren der Lösungsmittel ausgewaschen. Um das Harz in die benötigte H⁺-Form überzuführen, wurde so lange mit 1 N HCl gewaschen, bis im Filtrat kein Natrium mehr nachweisbar war (Flammenfärbung). Nach Neutralwaschen mit H₂O wurde das Harz in TFE/MeOH (1:6/v:v) übergeführt.

Da alle Trennungen wegen der schlechten Löslicheitseigenschaften der Substrate bei erhöhter Temperatur (48°C) durchgeführt werden mussten, wurde das Harz und das Lösungsmittel vorteilhafterweise vor dem Einfüllen in die Säule auf dieser Temperatur thermostatisiert. Nach Auftragen der Probe wurde so lange mit Lösungsmittel eluiert, bis nach Eindampfen der Lösung auf dem Uhrglas kein Rückstand mehr feststellbar war (Uhrglas-Test !).

Die Effizienz der jeweiligen Trennungen wurde jedesmal mittels des Ninhydrin-Testes (1.1.2.) überprüft.

7.2. Filtration von Bz-(Leu)₆ (5.3.)

2,27 g Bz-(Leu)₆ (5.3.) wurden unter Erwärmen in 50 ml MeOH aufgenommen. Die Substanz ging sofort in Lösung. Ein Teil jedoch kristallisierte schon nach wenigen Minuten wieder aus. Dieses Kristallisat wurde abfiltriert und am Hochvakuum bei 50°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 1,008 g, der Ninhydrin-Test war positiv (Fraktion II).

Nach Eindampfen der Mutterlauge und Trocknen bis zur Gewichtskonstanz am Hochvakuum bei 45°C erhielt man 671 mg eines schwach gelblichen Produktes. Der Ninhydrin-Test war ebenfalls stark positiv (Fraktion I).

903 mg des Kristallisates II wurden in 460 ml MeOH (p.A.) bei erhöhter Temperatur gelöst und auf eine 5 g Säule gegeben. Es wurde so lange mit MeOH eluiert, bis der Uhrglas-Test negativ war (130 ml). Nach Eindampfen der methanolischen Lösung und Trocknen des Rückstandes blieben 797 mg Produkt zurück. Der Ninhydrin-Test zeigte keine positive Reaktion (Fraktion IV).

Analog wurden auch 635 mg der Fraktion I (in 50 ml MeOH gelöst) getrennt und isoliert.

Der Verlust an Peptidmaterial infolge der Filtration betrug 30 % (Fraktion III). Der Ninhydrin-Test war ebenfalls absolut negativ.

7.3.-7.7. Filtration von nachbehandeltem Bz-(Leu)₆

Die folgenden Benzoyl-Resinopeptide, welche ursprünglich Simulierkupplungen unterworfen wurden, trennte man auf 2 g Säulen. Es galten die in 7.1. angeführten Vorschriften.

Herkunft:	Einwaage (mg):	gelöst in ml TFE/MeOH (1:6/v:v):	Verlust (%):	Bezeichnung des Produktes:
5.6.	650	250	75	7.3.
5.7.	750	200	50	7.4.
5.8.	570	200	46	7.5.
5.9.	308	100	35	7.6.
5.10.	203	50	22	7.7.

Die Ninhydrin-Teste waren bei sämtlichen Proben negativ.

7.8. Filtration von nachbehandeltem Irr-(Leu)₆ (5.11.)

Die folgenden Benzoyl- resp. Acetyl-Resinopeptide, welche ursprünglich Simulierkupplungen unterworfen wurden, trennte man auf 2 g Säulen. Es galten die in 7.1. angeführten Vorschriften. Tabelle siehe folgende Seite.

7.9. Filtration eines Gemisches von Bz-(Leu)₆ (7.2./IV)
und Phe-(Leu)₆ (5.12.)

40 mg Bz-(Leu)₆ (7.2./IV) und 40 mg Phe-(Leu)₆ (5.12.) wurden in 340 ml TFE/MeOH (1:6/v:v) gelöst und auf einer 2 g Säule nach der in 7.1. beschriebenen Methode getrennt. Nach den üblichen Trocknungsprozeduren erhielt man 39 mg Ninhydrin-negatives Produkt.

Filtration von eingelagertem Irr-(Leu)_n (5.11.)

1. Filtration:						
Irr=	n=	Einwaage (mg):	gelöst in ml TFE/MeOH (1:6/v:v)	Verlust (%):	Ninhydrin-Test vor: nach:	
Bz	1	126	29	38	pos.	neg.
Bz	1	90	29	26	pos.	neg.
Ac	2	171	29	43	schw. pos.	neg.
Ac	2	195	29	34	schw. pos.	schw. pos. +
Ac	3	220	29	25	schw. pos.	schw. pos. +
Bz	3	239	29	60	schw. pos.	schw. pos. +
Ac	4	371	29	43	pos.	schw. pos. +
Ac	4	339	29	37	pos.	neg.
Bz	5	390	29	43	pos.	schw. pos. +
Ac	5	400	200	-	pos.	neg.
Ac	6	80	305	67	pos.	neg.
Ac	6	80	305	39	pos.	schw. pos. +
2. Filtration:						
Ac	2	64	29	44	-	schw. pos. +
Ac	3	83	29	31	-	neg.
Bz	3	95	29	65	-	neg.
Ac	4	210	29	45	-	neg.
Bz	5	220	29	48	-	schw. pos. +
Ac	6	49	305	65	-	neg.
3. Filtration:						
Ac	2	55	29	45	-	neg.
Bz	5	205	29	59	-	neg.

+ Trennung wurde wiederholt.

Die bei der 2. und 3. Filtration angegebenen Verluste beziehen sich auf die in der 1. Filtration eingesetzte Einwaage.

8. Hydrolysen

8.1. Methode

Die zur Hydrolyse verwendeten Ampullen (dickwandiges Pyrex-Glas, 20 ml) wurden vor Gebrauch über Nacht in Putzsäure gelegt. Nach Spülen mit dest. Wasser und verd. HCl wurden die Ampullen in einem Trockenschrank getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

Es wurden Proben von je ca. 20-50 mg eingewogen. Nach Lösen in 2,5 ml Trifluoräthanol wurden 2,5 ml HCl konz. (p.A.) zugegeben. Man erhielt klare Lösungen. Nun wurden die Ampullen mit dem Analysengut in Trockeneis/Methanol eingefroren. Nach mehrmaligem Spülen mit Stickstoff und Evakuieren an der Wasserstrahlpumpe schmolz man die Ampullen zu.

Die Proben wurden in einem auf 110°C thermostatisierten Ölbad während 72 h hydrolysiert.

8.2. Hydrolyse von Irr-(Leu)_n (7.3.-7.9.)

Zwischen 20 und 200 uMol der entsprechenden Benzoyl- resp. Acetyl-Resinopeptide wurden nach der in 8.1. beschriebenen Methode hydrolysiert. Die Hydrolysate waren i.d.R. schwach bräunlich gefärbt.

9. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Träger: Kieselgel G Merck (Zinksilikat als UV-Indikator)

Auftragen der Proben: Von den ungeschützten Oligoleucinen wurden je 20 μ l-30 μ l in 1-2 μ Mol Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPT) aufgetragen. Das Lösungsmittel wurde durch 1 -ständiges Trocknen im Hochvakuum-Trockenschrank bei 80°C entfernt. Analoge Mengen geschützter Peptide wurden in analogen Mengen Trifluoräthanol gelöst und aufgetragen.

Entwickeln: Nach Trocknen der Chromatogramme wurden zunächst die UV-aktiven Flecken nachgewiesen (UV-Lampe, Absorption bei 254 nm). Anschliessend wurden die DC-Platten mit Ninhydrin-Lösung besprüht und 10 min im Trockenschrank bei 110°C entwickelt. Nach 10 minütiger Reaktion in einer mit Chlor gesättigten Kammer wurden die Platten 3-5 min mit einem Föhn abgeblasen. Danach sprühte man Tolidin-Lösung.

9.1. DC von (Leu)_n

(DC befindet sich in 5.3. des theoretischen Teils)

Aufgetragene Substanzen: Rohprodukte von (Leu)_n (5.2.)

Auftragemenge: 20 μ l und 40 μ l

Fliessmittel: sec. BuOH/1 % NH₃ (wässr.) (100:44/v:v)

Zusammenfassung

Die Synthese von Benzoylhexaleucyl-Polymer wurde ausgehend vom Leucyl-Polymer nach der sog. Merrifield-Technik durchgeführt. Verschiedene, voneinander unabhängige analytische Kontrollen des Syntheseverlaufes lassen bei sämtlichen Kupplungsschritten auf unvollständigen Reaktionsumsatz schliessen. Das Produkt der Festphasensynthese kann somit nicht einheitlich sein, obwohl sich bei säulen- und dünnsschichtchromatographischen Untersuchungen ausser Benzoylleucin keine kleineren Peptidfragmente nachweisen liessen. Offensichtlich sind diese Nachweismethoden zum Nachweis der Nebenprodukte nicht geeignet.

Die während der Festkörpersynthese von Hexaleucin beobachtete Peptidspaltung gab Anlass, die in der Literatur bereits postulierte, jedoch bisher noch nicht nachgewiesene Backbone-Acylierung als Zwischenstufe bei der Peptidspaltung nachzuweisen. Unter Backbone-Acylierung (BA) verstehen wir die Acylierung eines Amidstickstoffes einer Peptidbindung durch eine aktivierte Aminosäure unter Kupplungsbedingungen.

Das aus der BA resultierende Diacylimid kann neben Peptidspaltung den Aminosäurerest in die Amidbindung einlagern (Aminoacyleinlagerung). Der Nachweis der dadurch entstandenen Einlagerungspeptide muss als Beweis für die Existenz der BA bewertet werden.

Zum Nachweis der BA setzten wir u.a. Benzoylhexaleucyl-Polymer mehrere Male den bei der Peptidsynthese üblichen Kupplungsbedingungen aus. Die Tatsache, dass sich bei der Festphasensynthese Nebenprodukte auf dem Harz akkumulieren, ermöglichte es uns, durch mehrfaches Wiederholen

der Kupplungsprozeduren die BA-Rate zu steigern, d.h. die Einlagerungspeptide auf dem Harz anzureichern.

Tatsächlich konnten im vom Harz abgelösten Peptidmaterial durch ein indirektes Verfahren Einlagerungspeptide nachgewiesen werden. Die Konzentration der Einlagerungspeptide und somit das Ausmass der BA ist der Anzahl und der Dauer der Kupplungen proportional.

Wir betrachten somit die Existenz der BA als bewiesen.

Die bei sämtlichen BA-Versuchen beobachtete Peptidspaltung nimmt mit steigender Konzentration an Einlagerungspeptid zu. Peptidspaltung und Aminoacyleinlagerung müssen somit die BA als gemeinsame Reaktionsstufe besitzen.

Literaturverzeichnis

Nach Helvetica Chimica Acta

- 1 R.B. Merrifield J.Amer.chem.Soc. 85, 2149 (1963)
- 2 J.M. Steward, J.D. Young Solid Phase Peptide Synthesis San Franzisko 1968
- 3 R.B. Merrifield Adv. Enzymology 32, 221 (1969)
- 4 M. Bodanszky, J.T. Sheehan Chem.and Ind. 1597 (1966)
- 5 S. Karlsson, G. Lindeberg, J. Porath, U. Ragnarsson Acta chem.scand. 24, 1010 (1970)
- 6 L. Zervas, D. Borovas, E. Gazis J.Amer.chem.Soc. 85, 3660 (1963)
- 7 W. Kessler, B. Iselin Helv. 49, 1330 (1966)
- 8 V.A. Najjar, E.B. Merrifield Biochemistry 5, 3765 (1966)
- 9 E. Bayer Chemie f. Labor u. Betrieb 5, 193 (1969)
- 10 H.C. Beyermann, E.W. De Leer, W. van Vossen J.C.S. Chem.Comm. 929, (1972)
- 11 M. Rothe, J. Mazánek Angew.Chem. 84, 290 (1972)
- 12 B.F. Gisin, R.B. Merrifield J.Amer.chem.Soc. 94, 3102 (1972)
- 13 P. Dunn Rec.Trav.chim.Pays-Bas 71, 676 (1956)
- 14 J.B. Polya, T.M. Spotswood Rec.Trav.chim.Pays-Bas 68, 753 (1949)
- 15 J.B. Polya, T.M. Spotswood Rec.Trav.chim.Pays-Bas 67, 927 (1948)
- 16 J.B. Polya, P.L. Tardrew J.chem.Soc. 1081 (1948)
- 17 R.B. Mariella, K.H. Brown J.org.Chemistry 36, 735 (1971)
- 18 M. Bergmann, V. du Vigneaud, L. Zervas Chem.Ber. 62, 1909 (1929)
- 19 F. Weygand, R. Geiger, U. Glöckler Chem.Ber. 89, 1543 (1956)
- 20 F. Weygand, M. Reiher Chem.Ber. 88, 26 (1954)
- 21 Th. Wieland, H. Mohr Annal.d.Chem. 599, 222 (1956)
- 22 Th. Wieland, H. Urbach Annal.d.Chem. 613, 84 (1958)

- 23 A. Dehn J.Amer.chem.Soc. 34, 1402 (1912)
- 24 M. Brenner, J.P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt,
I. Photaki Exp. 11, 397 (1955)
- 25 M. Brenner Journal of Cellular and Comparative Physiology
54, 221 (1959)
- 26 T.R. Telesnina, V.K. Antonov, M.M. Shemjakin
Z.obsc.Chim. 38, 1691 (1968)
- 27 J.S. Davies, C.H. Hasall, K.H. Hopkins Chem.Comm. 16, 1118
(1971)
- 28 A.R. Mitchell, R.W. Roeske J.org.Chemistry 35, 1171 (1970)
- 29 L.C. Dorman Tetr.Lettr. 28, 2319 (1969)
- 30 K. Esko, S.Karlsson, J.Porath Acta chem.scand. 22, 3342 (1968)
- 31 L.D. Markley, L.C. Dorman Tetr.Lettr. 21, 1787 (1970)
- 32 B. Gisin Analyt.chim.Acta
- 33 W. Geising, S.Hörnle Z.physiol.Chem. 352, 5 (1971)
- 34 E. Bayer J.Amer.chem.Soc. 94, 265 (1972)
- 35 F. Weygand, R. Obermeier Z.f.Naturf. 23, 1390 (1968)
- 36 E. Kaiser, R.L. Coleseott, C.D. Bossinger, P.I. Cook
Anal.Biochem. 34, 595 (1970)
- 37 Th. Wieland, H. Wissenbach Angew. Chem. 81, 782 (1969)
- 38 H. Wissmann, R. Geiger Angew.Chem. 82, 937 (1970)
- 39 S. Moore, D.H. Spackman, W.H. Stein Anal. Chem. 30, 1185 (1958)
- 40 D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
- 41 S. Moore Methods in Enzymology 6, 819 (1963)
- 42 P. Fankhauser, M. Brenner The Chemistry of Polypeptides:
Essays in honour of Dr. L. Zervas, Ed. Katsoyanis,
Plenum Publish. Corp., New York (im Druck)
- 43 K. Brunfeld, P. Roepstorff, J. Thomson Acta chem.scand.
23, 2906 (1969)
- 44 V. Gut, J. Rudinger Peptides 1968 (S. 185), Ed. E. Bricas
North Holl. Publish. Comp. Amsterdam
- 45 P. Fankhauser, B. Schilling, M. Brenner Peptides 1971
Ed. H. Nesvadba, North. Holl. Publish. Comp. Amsterdam

- 46 M. Bodanszky, J.T. Sheehan Chem. and Ind. 1423 (1964)
- 47 E. Abderhalden Z.f.physiol. Chem. 132, 245 (1924)
- 48 E. Grell, Dissertation Basel (1969)

Curriculum vitae

Am 31. Mai 1946 wurde ich, Bernd Schilling, als Sohn des Franz Schilling, Werkzeugmacher, von Griessen Krs. Waldshut, und der Ursula, geb. Schreyeck, in Stuttgart geboren.

In Griessen besuchte ich die Volksschule und anschliessend das Heinrich-Suso-Gymnasium in Konstanz, wo ich 1965 das Abitur bestand. Im Sommersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach und Mathematik, Physik, physikalische Chemie und Zoologie als Nebenfächer. Im April 1967 bestand ich das erste Vordiplom (organische Chemie, anorganische Chemie, Mathematik), im April 1968 das zweite Vordiplom (Physik und Zoologie) und im Juni 1970 das Diplomexamen.

Die vorliegende Arbeit begann ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Brenner im August 1970.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika folgender Dozenten:

H. Balli, M. Brenner, R. Conzelmann, H. Erlenmeyer, S. Fallab, C. Grob, F. Grün, P. Huber, Th. Kaden, H. Nüesch, A. Portmann, P. Schiess, H. Seiler, Ch. Tamm, M. Thürkaut, R. Zürcher.

